

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Adéla Zárybnická

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ 7-DEHYDROCHOLESTEROLU JAKO
BIOMARKERU SMITHOVA-LEMLIHO-OPITZOVA SYNDROMU

VOLTAMMETRIC DETERMINATION OF 7-DEHYDROCHOLESTEROL AS A BIOMARKER OF
SMITH-LEMLI-OPITZ SYNDROM

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Karolína Schwarzová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Jan Klouda

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 15. června 2020.

Abstrakt

Cílem této práce byl vývoj voltametrické metody pro stanovení 7-dehydrocholesterolu jako biomarkeru dědičného onemocnění Smithova-Lemliho-Opitzova syndromu. V případě tohoto onemocnění vzroste koncentrace 7-dehydrocholesterolu v plasmě řádově stokrát na stovky až tisíce $\mu\text{mol l}^{-1}$. Stanovení 7-dehydrocholesterolu probíhalo v této práci v umělém séru, které bylo připraveno tak, aby simulovalo podmínky postnatální diagnostiky Smithova-Lemliho-Opitzova syndromu. 7-dehydrocholesterol poskytuje dobře vyvinutý voltametrický signál okolo +0,8 V vs. Ag/AgNO₃ v acetonitrilu. Pro stanovení 7-dehydrocholesterolu byla využita diferenční pulzní voltametrie s optimalizovanými parametry. Přítomnost proteinu v umělém séru (lidský sérový album) měla za následek neakceptovatelně vysoký limit detekce metody (178 $\mu\text{mol l}^{-1}$ v umělém séru). Z toho důvodu byl lidský sérový albumin ze vzorků umělého séra eliminován jeho vysrážením pomocí acetonitrilu a následným odstředěním vzniklé suspenze. Pomocí acetonitrilu byl také upraven poměr vodné a organické složky ve studovaném prostředí tak, aby bylo dosaženo optimální voltametrické odezvy 7-dehydrocholesterolu. S ohledem na ředění vzorku umělého séra a velikost voltametrické odezvy bylo zvoleno optimální prostředí pro stanovení 7-dehydrocholesterolu acetonitril – umělé sérum 9:1. V tomto prostředí bylo dosaženo limitu detekce 1,5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ v umělém séru, tedy dostatečně nízkého pro screening Smithova-Lemliho-Opitzova syndromu. Metodou standardního přídávku byl 7-dehydrocholesterol stanoven ve třech vzorcích o koncentraci 30, 100 a 250 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Bylo dosaženo výtěžnosti metody 43–70 %, je tedy patrné, že je třeba další optimalizace postupu. Velmi dobré regresní parametry koncentračních závislostí získaných metodou standardního přídávku ($>0,99$) naznačují, že elektrochemická detekce je přesná a v budoucnosti je nutné se zaměřit na ztráty 7-dehydrocholesterolu způsobené předúpravou vzorku, především eliminací proteinů ze studované matrice. V této diplomové práci je popsána jednoduchá a levná metoda s vysokým potenciálem pro využití v *point-of-care* testování v zařízeních bez přímého přístupu ke komplikovanému instrumentálnímu laboratornímu vybavení.

Klíčová slova

7-dehydrocholesterol, bórem dopovaný diamant, oxidace, Smithův-Lemliho-Opitzův syndrom, voltametrie

Abstract

The aim of this thesis was the development of a voltammetric method for the determination of 7-dehydrocholesterol as a biomarker of congenital disease Smith-Lemli-Opitz syndrome. The concentration of 7-dehydrocholesterol in plasma will increase hundred-fold to hundreds to thousands $\mu\text{mol L}^{-1}$ in patients suffering from Smith-Lemli-Opitz syndrome. The determination of 7-dehydrocholesterol was carried out in artificial serum in this work, which was prepared to mimic the conditions of postnatal diagnosis of Smith-Lemli-Opitz syndrome. 7-dehydrocholesterol provides a well developed voltammetric signal at approximately +0.8 V vs. Ag/AgNO₃ in acetonitrile. Differential pulse voltammetry with optimized parameters was used for the determination of 7-dehydrocholesterol. The presence of protein in artificial serum (human serum albumin) resulted in an unacceptably high detection limit of the method (178 $\mu\text{mol L}^{-1}$ in artificial serum). Therefore, human serum albumin was eliminated from the artificial serum samples by precipitating it with acetonitrile and subsequently centrifuging the resulting suspension. At the same time, the ratio of aqueous and organic components in the studied medium was also adjusted with acetonitrile to achieve an optimal voltammetric response of 7-dehydrocholesterol. With regard to the dilution of the artificial serum sample and the size of the voltammetric response, the optimal medium for the determination of 7-dehydrocholesterol acetonitrile – artificial serum 9:1 was selected. In this medium, the detection limit of 1.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ in artificial serum was achieved. This detection limit is low enough for the screening of Smith-Lemli-Opitz syndrome. Using the standard addition method, 7-dehydrocholesterol was determined in three samples with respective concentrations of 30, 100 and 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The recovery of the method was 43 – 70 %, therefore, it is clear that further optimization of the method is needed. Very good regression parameters of the concentration dependencies obtained by the standard addition method (> 0.99) indicate that the electrochemical detection is accurate. Therefore, in the future, it is necessary to focus on the losses of 7-dehydrocholesterol caused by the sample pretreatment, especially the elimination of proteins from the studied matrix. This diploma thesis describes a simple and inexpensive method with high potential for use in point-of-care testing in facilities without a direct access to complicated instrumental laboratory equipment.

Key words

7-dehydrocholesterol, boron doped diamond, oxidation, Smith-Lemli-Opitz syndrome, voltammetry

Tato práce vznikla s podporou Grantové agentury České republiky (projekt 19-11268S).

Poděkování

Chtěla bych tímto poděkovat své školitelce doc. RNDr. Karoline Schwarzové, PhD. za cenné rady a odborné vedení mé práce. Velký dík také patří Mgr. Janu Kloudovi, který mi vždy věnoval svůj čas a trpělivost.

Nejvíce bych však chtěla poděkovat své rodině, která mě podporovala po celou dobu studia a zejména mým prarodičům, kteří mi nezapomněli zavolat před jedinou zkouškou.

Obsah

ABSTRAKT	3
SEZNAM ZKRATEK	7
1 TEORETICKÁ ČÁST	9
1.1. CÍL PRÁCE.....	9
1.2. SMITHŮV-LEMLIHO-OPITZŮV SYNDROM (SLOS).....	9
1.2.1. <i>Klinické projevy SLOS</i>	12
1.2.2. <i>Léčba SLOS</i>	15
1.2.3. <i>Diagnostika SLOS – metody stanovení 7-DHC</i>	18
1.3. ELEKTROCHEMICKÉ VLASTNOSTI 7-DHC A PŘÍBUZNÝCH STEROLŮ.....	20
1.4. BÓREM DOPOVANÝ DIAMANT	24
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
2.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A PŘÍPRAVA ROZTOKŮ.....	27
2.2. VOLTAMETRIE	27
2.3. STANOVENÍ 7-DHC V SÉRU METODOU STANDARDNÍHO PŘÍDAVKU	28
2.4. VYHODNOCENÍ	29
3 VÝSLEDKY A DISKUZE	30
3.1. VLIV POMĚRU ACETONITRIL – VODNÁ SLOŽKA NA VOLTAMETRICKOU ODEZVU 7-DHC	30
3.2. VLIV PH NA VOLTAMETRICKOU ODEZVU 7-DHC	33
3.3. KONCENTRAČNÍ ZÁVISLOST V PROSTŘEDÍ UMĚLÉ SÉRUM – ACETONITRIL (5:95)	35
3.4. ZJEDNODUŠENÍ MATRICE – VYSRÁŽENÍ PROTEINŮ	36
3.5. KONCENTRAČNÍ ZÁVISLOST V PROSTŘEDÍ ACETONITRIL – SÉRUM 90:10 PO VYSRÁŽENÍ PROTEINŮ.....	39
3.6. STANOVENÍ 7-DHC METODOU STANDARDNÍHO PŘÍDAVKU	41
4 ZÁVĚR.....	44
POUŽITÁ LITERATURA	46

Seznam zkratek

7-DHC	7-dehydrocholesterol
7-DHCR	7-dehydrocholesterolreduktáza
7-DHD	7-dehydrodesmosterol
8-DHC	8-dehydrocholesterol
ACN:H ₂ O	poměr acetonitril – voda
ACN:ser	poměr acetonitril – umělé sérum
APCI	chemická ionizace za atmosferického tlaku
BDDE	bórem dopovaná diamantová elektroda
<i>c</i>	molární koncentrace [mol l ⁻¹]
CV	cyklická voltametrie
CVD	chemická depozice par, chemical vapour deposition
CVS	vzorky choriových klků, chorionic villus samples
DPV	diferenční pulzní voltametrie
<i>E</i>	potenciál [V]
GC	plynová chromatografie, gas chromatography
GC-FID	plynová chromatografie s plamenovou ionizační detekcí
GCE	elektroda ze skelného uhlíku, glassy carbon electrode
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
HSA	lidský sérový albumin, human serum albumin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<i>I</i>	proud [A]
LC	kapalinová chromatografie, liquid chromatography
L _D	limit detekce

MS	hmotnostní spektrometrie, mass spectrometry
MS-SIM	hmotnostní detekce selektivního záznamu iontu
pH	záporně vzatý dekadický logaritmus aktivity oxoniových kationtů
RSD	relativní směrodatná odchylka, relative standard deviation
SLOS	Smithův–Lemliho–Opitzův syndrom
TOF-SIMS	<i>time of flight</i> hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů

1 Teoretická část

1.1. Cíl práce

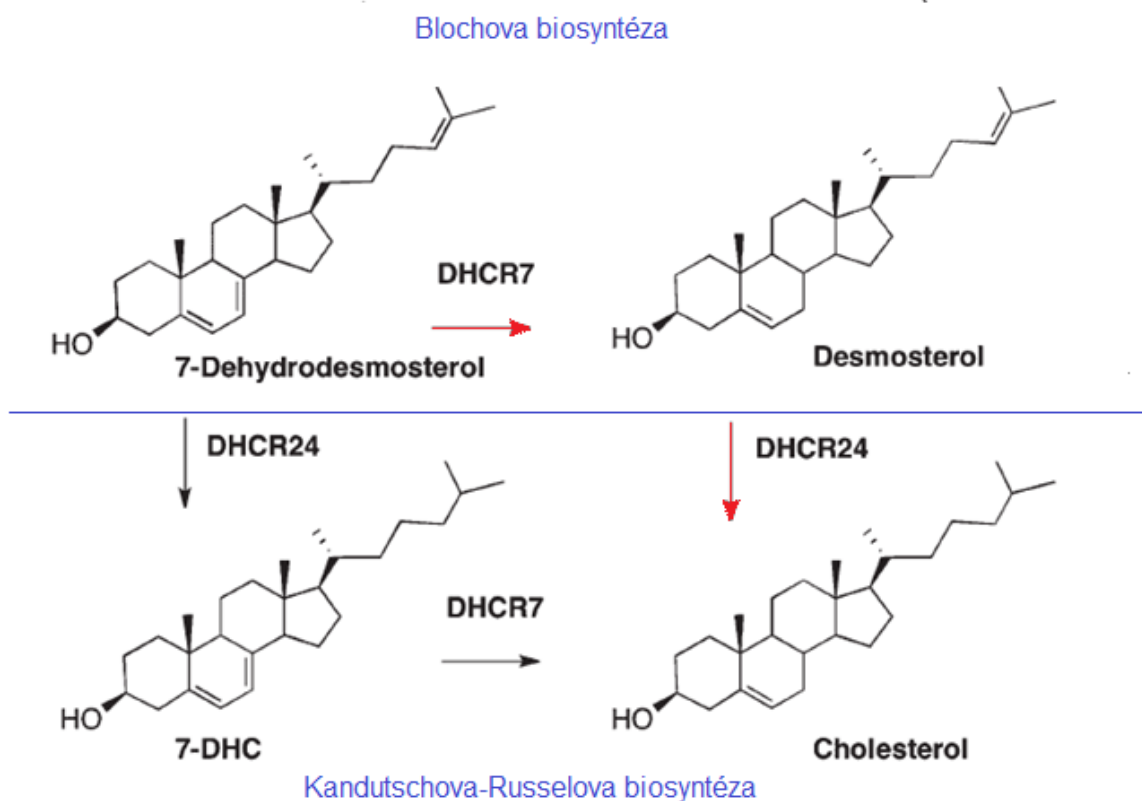
Cílem této diplomové práce bylo vyvinout voltametrickou metodu pro stanovení 7-dehydrocholesterolu (7-DHC) v umělém krevním séru jako biomarkeru Smithova-Lemliho-Opitzova syndromu (SLOS) za využití bórem dopované diamantové (BDD) elektrody.

1.2. Smithův-Lemliho-Opitzův syndrom (SLOS)

V roce 1964 bylo Davidem Smithem, Lucem Lemlim a Johnem Opitzem popsáno do té doby neznámé onemocnění (1). Na případové studii tří pacientů, které spojoval nezvyklý vzhled tváře, mikrocefalie, mentální retardace, těžké poruchy výživy a celkově opožděný vývoj, definovali nové onemocnění. V následujících dvaceti letech probíhalo intenzivní studium tohoto nového syndromu zaměřené jak na klinické projevy onemocnění a jeho dědičnost, tak na patobiochemické procesy probíhající v tělech pacientů (2–4). V této době také onemocnění vstoupilo do povědomí široké veřejnosti jako SLOS. Jedná se o autosomálně recesivní dědičné onemocnění, pro nějž je charakteristická deficitní aktivita enzymu 7-dehydrocholesterol reduktázy (7-DHCR) (5). Jde o první syndrom zařazený do vrozených vývojových vad ve sterolových syntézách (5,6). Příčinou je mutace genu pro 7-DHCR, který je kódován 9 exony, přičemž u pacientů bylo identifikováno přes 100 mutací (7). Enzym 7-DHCR je zodpovědný za katalýzu posledního kroku Kandutschovy-Russellovy (8) biosyntézy cholesterolu, tedy za redukci dvojné vazby na C7 u 7-DHC (cholesta-5,7-dien-3 β -ol), respektive za přeměnu 7-dehydrodesmosterolu (7-DHD, cholesta-5,7,24-trien-3 β -ol) na desmosterol v Blochově biosyntéze cholesterolu (obr.1). Relativně složitá biosyntéza cholesterolu zahrnuje více než 20 specializovaných enzymů a komplexní buněčné mechanismy intracelulárního třídění a transportu. Defektní enzym 7-DHCR způsobuje nedostatečnou produkci cholesterolu a akumulaci 7-DHC a jeho izomeru 8-dehydrocholesterolu (8-DHC, cholesta-5,8-dien-3 β -ol) v plasmě i dalších tkáních (9).

Cholesterol je nezbytnou sloučeninou pro život všech zvířat. Je syntetizován *de novo* výše zmíněnými biochemickými procesy nebo je přijímán z potravy. Je klíčovým komponentem buněčných membrán a je zodpovědný za jejich fluiditu (10). Je také součástí

neuronového myelinu a hlavní lipidovou složkou v lidském mozku (11). Zde je podstatné, že cholesterol nemůže překročit hematoencefalickou bariéru, a v mozku je proto produkován téměř výhradně *de novo*. Dále je cholesterol prekurzorem steroidních hormonů a žlučových kyselin, tedy biomolekul, které hrají velmi významné role v regulaci genové exprese a v zažívání (12, 13). Proto není divu, že jakákoliv porucha v biosyntéze cholesterolu má devastující účinky na strukturu buněčné membrány a celkovou funkci organismu (14).



Obr. 1 Poslední dva kroky Kandutschovy-Russelovy a Blochovy biosyntézy cholesterolu. Převzato z (15).

Biochemický původ SLOS byl dlouhou dobu neznámý, a to i přes to, že v polovině 80. let minulého století bylo popsáno mnoho abnormalit ve steroidním metabolismu lidí (16). Primární původ onemocnění popsali Natowicz a Evans (17), když v moči tří ze čtyř pacientů trpících SLOS nebyli schopni stanovit standardní žlučové kyseliny (produkty oxidace cholesterolu, v případě SLOS často přítomného v nízkých koncentracích) a u jednoho stanovili abnormální množství standardních žlučových kyselin. Naopak detekovali nestandardní žlučové kyseliny pocházející ze 7-DHC. Následná analýza plasmy

pacientů trpících SLOS ukázala více než 1000násobnou hladinu 7-DHC, což vedlo k označení nedostatečnosti 7-DHCR za původce tohoto onemocnění (5). Na základě těchto zjištění byl 7-DHC později identifikován jako spolehlivý biomarker SLOS, čehož je využito i v této práci.

Všeobecná shoda panuje ohledně enzymatické příčiny SLOS. Je však pravděpodobné, že za patologickými projevy stojí vedle nedostatku cholesterolu sekundární nemetabolické defekty spojené s tvorbou nebezpečných oxysterolů (18). Lipidy mají tendenci podléhat radikálovým reakcím s kyslíkem. Tento proces je označován jako lipidová peroxidace a dává vzniknout řadě peroxidových produktů (19). Z cholesterolu a intermediátů při jeho biosyntéze jsou touto cestou vytvářeny sloučeniny zvané oxysteroly. Jedná se o biologicky aktivní látky, které regulují cholesterolovou homeostázi, ale mohou působit i cytotoxicky (20). Produkce oxysterolů je obecně zvýšena v případě defektu v biosyntéze cholesterolu a nárůstu koncentrace intermediátů, jako je 7-DHC (21). Množství oxysterolových produktů odvozených od 7-DHC je v porovnání s cholesterolem širší, což je způsobeno tím, že cholesterol je monoalken, zatímco 7-DHC je dien a v důsledku toho výrazně reaktivnější (rychlostní konstanta pro jeho oxidaci je asi 200krát vyšší než v případě cholesterolu) (21).

Pozitivním aspektem zvýšené koncentrace 7-DHC může být zvýšení syntézy vitamínu D₃, který zabraňuje rozvoji osteomalacie a křivice (22). Samotná nízká koncentrace cholesterolu v tkáních představuje další potenciální zdravotní benefit, jelikož cholesterol je nutnou složkou buněčných membrán nutnou pro vstup či opuštění buňky mikroorganismy (23). Tyto potencionální zdravotní benefity jsou však v porovnání s negativními aspekty onemocnění marginální.

Odhady incidence SLOS se liší podle užití diagnostické metodiky, ale i v závislosti na etnickém původu studovaného vzorku populace. Jeden z prvních odhadů incidence SLOS byl vytvořen Lowrym a Yongem, kteří odhadli četnost onemocnění v Britské Kolumbii v Kanadě na 1:40 000. Jakmile zahrnuli i méně závažné případy, tato incidence vzrostla na 1:20 000 (24). V České republice byla uvedena dokonce četnost vyšší než 1:10 000 (25). Je však nutné vzít v potaz, že tyto vysoké hodnoty četnosti byly stanoveny výlučně na základě klinických diagnóz, kde existuje vyšší pravděpodobnost výskytu falešně pozitivních případů (záměna jiného onemocnění za SLOS). V podobné populaci diagnostikované biochemicky byla incidence výrazně nižší (26). Jeden z novějších odhadů uvádí incidenci SLOS 1:20 000 až 1:60 000 (27). V geneticky rozmanité populaci USA lze

pozorovat výrazné rozdíly v počtu diagnostikovaných případů mezi etnickými skupinami obyvatel. Oproti obyvatelům s africkými či asijskými kořeny byl výrazně vyšší výskyt SLOS popsán u obyvatelstva evropského původu (25).

1.2.1. Klinické projevy SLOS

Jedinci postižení SLOS vykazují velmi široké spektrum projevů. Zprv je to způsobeno tím, že cholesterol je přítomen ve všech tkáních v lidském těle, a proto se jeho nedostatek projevuje jako multiorgánová porucha. Zadruhé se na základě různé míry deficitu 7-DHCR liší závažnost těchto projevů. Ty mohou být na škále od málo ovlivněných jedinců, trpících lehkými fyzickými anomáliemi a charakteristickými poruchami v učení a chování, až po vážně postižené jedince, často umírající *in utero* nebo v perinatálním období z důvodů závažných tělesných deformací (14). Mezi znaky, které pacienty trpící SLOS spojují a jsou velmi příznačné, jednoznačně patří tzv. „SLOS tvář“ a syndaktylie 2 a 3 prstu (obr. 2).



Obr. 2 Obrázek (A) Typické projevy SLOSu: mikrocefalii, bitemporální zúžení, ptóza, krátký nosní kořen, rozšířené nozdry a mikrognatia. Obrázek (B) Syndaktylie 2 a 3 prstu. Obrázek (C) SLOS s mírným fenotypem. Upraveno z (28).

Do doby, než byla známa biochemická podstata onemocnění, navrhlo několik autorů rozdělit SLOS na základě klinické závažnosti do dvou skupin na SLOS I. typu s mírnějšími příznaky a závažnější SLOS II. typu (4,29). V roce 1987 Bailer a spol. vytvořili hodnotící systém klinické závažnosti SLOS podle stupně a počtu fyzických deformací různých orgánů (30). Tento systém byl dále upraven Kellym a Hennekamem v roce 2000 (26).

Hodnocené oblasti zahrnují mozkové, oční, ústní, kosterní a genitální defekty a na základě závažnosti jsou hodnoceny podle tab. 1. Hodnocení pro 10 kategorií je sečteno, poděleno maximální možnou hodnotou (20) a vynásobeno 100. Z výsledného čísla se fyzická závažnost SLOS dělí do tří kategorií: mírný (<20), klasický (20-50) a závažný (>50) (31).

Tab. 1 Hodnocení klinické závažnosti vyvinuté Bialerem (30) a upravené (26).

<i>Orgán</i>	<i>Skóre</i>	<i>Kritéria</i>
<i>Mozek</i>	1	záchvaty, kvalitativní abnormalita MRI
	2	2 hlavní malformace CNS, gyrální vady
<i>Ústní</i>	1	dvojklaný čípek nebo submukózní rozštěp
	2	rozštěp tvrdého patra nebo střední rozštěp rtu
<i>Periferie (prsty, ušní boltce, brada)</i>	0	minimální prstová syndaktylie bez tvaru Y
	1	syndaktylie 2 a 3 prstu ve tvaru Y, horní nebo dolní polydaktylie, jiné syndaktylie
	2	jakékoliv dva znaky z výše uvedených
<i>Oči</i>	2	šedý zákal, mikroftalmie
<i>Srdce</i>	0	funkční defekty
	1	defekt jedné komory nebo cévy
	2	komplexní srdeční malformace
<i>Ledviny</i>	0	funkční defekt
	1	jednoduché cystické onemocnění ledvin
	2	renální ageneze, klinicky významné cystické onemocnění
<i>Játra</i>	0	indukovaná jaterní abnormality
	1	jednoduchá strukturální abnormalita
	2	progresivní jaterní onemocnění
<i>Plíce</i>	0	funkční plicní onemocnění
	1	abnormální lobace, hypoplazie
	2	plicní cysty, jiné hlavní malformace
<i>Střeva</i>	0	funkční onemocnění GIT
	1	pyrolická stenóza
	2	Hirschsprungova nemoc
<i>Genitálie</i>	1	Jednoduchá hypospadie
	2	Nejednoznačné nebo ženské genitálie v 46, XY, genitální malformace v 46, XX

Později byla potvrzena úzká souvislost mezi hodnocením fyzické závažnosti a biochemickými parametry, přičemž existuje inverzní souvislost mezi koncentrací cholesterolu v séru a klinickou závažností (31–33). S nižší koncentrací cholesterolu jsou projevy závažnější a zejména pak u pacientů s nejnižší koncentrací ($<181 \mu\text{mol l}^{-1}$) je úmrtnost vyšší (34). Ačkoliv je hodnocení fyzické závažnosti SLOS u užitečné pro zjištění míry vzorce malformace u postižených jedinců, nezohledňuje závažnost mentálního postižení, poruchy chování nebo potíže s příjmem potravy (35). To patří mezi postižení, která nejsou zohledněna v tab. 1 a pro jejich predikci je třeba biochemických metod diagnostiky. U novorozenců a kojenců jsou běžné problémy s krmením – obtížně polykají, zvrací, a celkově nejeví zájem o jídlo, díky čemuž jsou nedostatečně kojeni. U více než 50 % pacientů léčba vyžaduje krmení nasogastrickou sondou nebo zavedením gastrostomické sondy do žaludku. Pokud není včas rozpoznán vrozeně malý žaludek a intestinální dysmotilita, pak často dochází k zpětnému toku žaludečního obsahu do jícnu, tzv. jícnovému refluxu. Pacienti trpící SLOS mají často spolu s refluxem také alergii na mléčné a sójové proteiny (26).

Behaviorální rysy SLOS zahrnují podrážděnost, sebepoškozování, agresivitu nebo hyperaktivitu. Patří mezi ně i opakující se a rituální chování, poruchy pozornosti a poruchy autistického spektra. Závažné narušení spánkového cyklu se upravuje s věkem. Zatímco rodiče nemluvnat hlásí nadměrnou spavost, děti do 5-6 let přes den neusnou a v noci nespí 2-3 hodiny. Nespavost má tendenci se s věkem snižovat (36). Agresivita a sebepoškozování jsou přítomny u 60 až 90 % pacientů (37).

1.2.2. Léčba SLOS

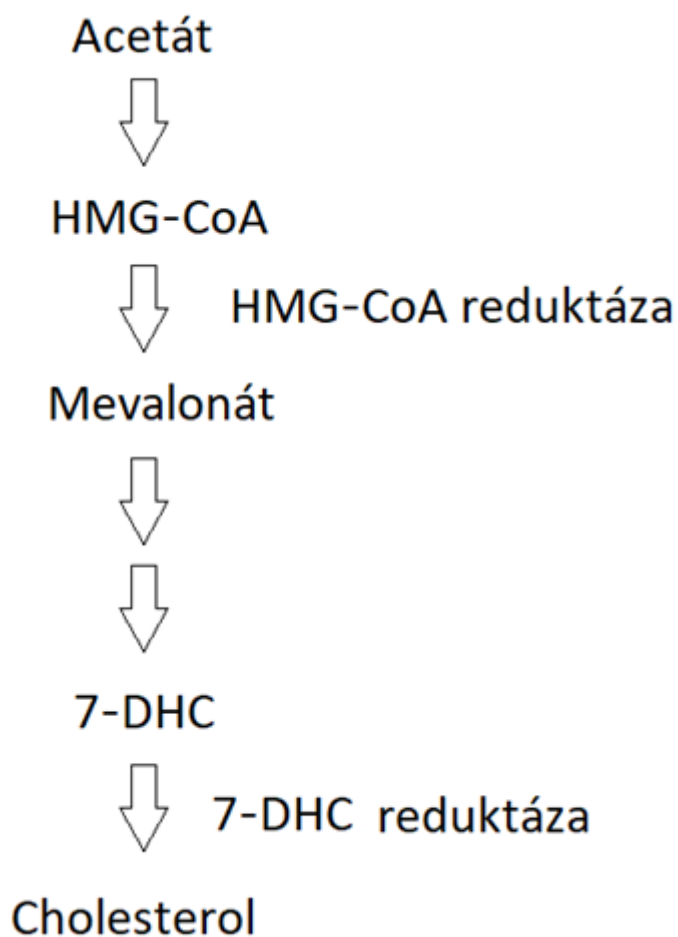
Délku života pacientů trpících SLOS lze odhadovat primárně podle závažnosti interních malformací a dostupnosti a kvality podpůrné péče. Často jsou nutné chirurgické zákroky k napravení vrozených anomálií a zmíněné umístění gastrostomie na podporu nutričního stavu (28). S odhalením biochemické příčiny SLOS v deficitu biosyntézy cholesterolu pokročila i lékařská péče o pacienty (26). Standardní léčbou SLOS se stala poněkud kontroverzní suplementace cholesterolu ve stravě, což má za následek zvýšení jeho hladiny a snížení biosyntézy, a tedy i akumulace reaktivního 7-DHC. Zpočátku byly navrhovány denní dávky cholesterolu 20–300 mg/kg v přirozené formě (vejce, smetana, játra, maso), nebo ve formě čistého cholesterolu přidaného do stravy s nebo bez suplementace žlučových kyselin (38). Odhadovaná denní dávka v kojeneckém věku se pohybuje mezi

30–40 mg/kg, které se v dospělosti sníží na průměrných 10 mg/kg/den (39). Několik studií z 90. let minulého století ukázalo, že suplementace cholesterolu zvyšuje jeho koncentraci v plasmě a má pozitivní vliv na behaviorální a afektivní změny u pacientů se SLOS (31,38,40). Ve studii z roku 2000 byl 4 dětským pacientům trpícím SLOS podáván cholesterol ve formě vaječného žloutku po dobu 4–8 týdnů a jeho výsledná koncentrace v plasmě se zvýšila o 56 %. Hodnoty 7-DHC zůstávaly konstantní, avšak snižovalo se jeho poměrné zastoupení v celkové koncentraci sterolů. Po 35týdenní suplementaci došlo k navýšení hladiny cholesterolu o 116 % a snížení 7-DHC o 67 % (41). Na druhou stranu 6 let trvající studie z roku 2004 ukazuje, že suplementace cholesterolu nezlepšuje vývoj dětí a adolescentů. Důvodem omezeného efektu mohou být časté malformace mozku a další anomálie, které připívají k mentální retardaci a na něž suplementace pochopitelně nemá vliv (42).

Kontroverze prenatální i postnatální suplementace cholesterolu spočívá v tom, že molekula cholesterolu nemůže projít fyziologickými bariérami jako je placenta nebo hematoencefalická bariéra. Proto, pokud terapie probíhá prenatálně, mohou mít těžce postižení novorozenci stále velmi nízkou hladinu cholesterolu v plasmě (až 1 mg/dl, 2 % fyziologických hodnot) (31). V případě postnatální terapie, z důvodu neprostupnosti hematoencefalické bariéry pro cholesterol, dochází k deficienci cholesterolu v nervové tkáni mozku a nevratným kognitivním a behaviorálním změnám (40). Dalším úskalím při suplementaci cholesterolu může být jeho snížená absorpce zapříčiněná nedostatkem žlučových kyselin, které v lidském těle plní roli emulgátorů lipidů a jejichž prekurzorem je právě cholesterol (5).

Dobře fungující lék musí prostupovat nebo jinak usnadňovat transport cholesterolu hematoencefalitickou bariérou (42). Jistou možností je simvastatin, který může procházet hematoencefalitickou bariérou, a proto má potenciál zlepšit neurologické a kognitivní funkce u pacientů trpících SLOS. Statiny se obvykle používají k léčbě hypercholesterolémie, protože inhibují funkci 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA) reduktázy (obr. 3). Tím také zabraňují vzniku a tedy akumulaci potenciálně toxických 7-DHC a 8-DHC v těle SLOS pacientů (43). Současně se paradoxně zvýší zbytková aktivita zmutované 7-DHCR, a tak i přeměna zbytkového 7-DHC na cholesterol (44). Avšak statiny zároveň přirozeně snižují hladinu cholesterolu, což je v případě SLOS nežádoucí účinek, proto je tato léčba typicky kombinována s cholesterolovou suplementací (45). Výsledky retrospektivní studie účinků simvastatinu na 39 pacientech trpících SLOS

v kombinaci s cholesterolovou suplementací ukázaly pokles poměru 7-DHC a cholesterolu v plasmě, avšak nebylo možné potvrdit zlepšení behaviorálních a růstových parametrů pacientů (46).



Obr. 3 Schéma biosyntézy cholesterolu.

1.2.3. Diagnostika SLOS – metody stanovení 7-DHC

Pokud je při běžném vyšetření plodu pomocí ultrazvuku zjištěna růstová vada či typická deformace, je přistoupeno ke klinickému vyšetření s cílem potvrdit, nebo vyvrátit diagnózu SLOS. V prenatalní diagnostice je jako biochemický marker SLOS využíván zejména 7-DHC. Ten může být stanoven v plodové vodě (referenční hodnoty v tab. 2), která se pro tyto účely standardně odebírá po 14. týdnu těhotenství a v případě SLOS je hladina 7-DHC typicky několikanásobně vyšší oproti referenčním hodnotám (32,47,48). Přímá analýza sterolového složení je možná ze vzorku choriových klků mezi 10. a 12. týdnem těhotenství (49). Jedná se o spolehlivou metodu, avšak zvýšení poměru 7-DHC/cholesterolu není tak velké jako nárůst koncentrace 7-DHC v plodové vodě (32). Oba tyto zákroky jsou invazivní a vyžadují amniocentézu v případě vyšetření z plodové vody či odběr choriových klků z placenty. Neinvazivní metodou mající potenciál pro diagnostiku SLOS je stanovení dehydroestriolu, vznikajícího ze 7-DHC, v moči těhotných žen (34,35).

Stejně jako v prenatalní, tak i v postnatalní diagnostice je jako biomarker SLOS využíván 7-DHC. Ten je v naprosté většině případů stanovován v krevní plasmě (referenční hodnoty v tab. 2) nejčastěji plynovou (GC) a kapalinovou chromatografií (LC). Plynová chromatografie s plamenovou ionizační detekcí (GC-FID) na kapilární koloně je bez derivatizace, rychlá a jednoduchá metoda (48). Ze suché krevní skvrny má 7-DHC mez stanovitelnosti $9,36 \mu\text{mol l}^{-1}$ s korelačním koeficientem $0,997 - 0,998$ (52). Metoda GC s hmotnostní detekcí se selektivním záznamem iontu (GC/MS-SIM) je lineární v rozsahu $9 - 1170 \mu\text{mol l}^{-1}$. Stanovení ze skvrny plné krve se zdlouhavou derivatizací trimethylsilanem poskytuje limit detekce (L_D) $1,74 \mu\text{mol l}^{-1}$ (53). Přímé stanovení bez extrakce a separace se provádí *time-of-flight* hmotnostní spektrometrií sekundárních iontů (TOF-SIMS), která k diagnostice SLOS využívá poměru cholesterolu/7-DHC. Jedná se o rychlou metodu, která, oproti vysokým pořizovacím nákladům, má ty provozní relativně nízké (54). Ovšem kvůli řadě jiných nevýhod se tato metoda řadí mezi méně používané. Běžně používaná GC/MS je na rozdíl od TOF-SIMS levná, více specifická metoda, která stanovuje přímo 7-DHC (53). Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI-MS) je citlivá metoda pro rychlou analýzu ze suché krevní skvrny a plasmy. Bez přípravy vzorku poskytne výsledky kvantitativní i kvalitativní analýzy do méně než 3 minut (55). S ohledem na vysokou citlivost 7-DHC a 8-DHC vůči peroxidačním reakcím byla vyvinuta metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s MS detekcí (HPLC/MS), která umožňuje stanovení přímo 7-DHC, 8-DHC a cholesterolu v krevní plazmě (56). Vzorek

plasmy s vnitřními standardy označenými deuteriem, derivatizovaný 4-fenyl-1,2,4-triazolin-3,5dionem má L_D na koloně $5,2 \cdot 10^{-11} \mu\text{mol l}^{-1}$, což je tisícinásobné zlepšení porovnání s L_D stanoveným HPLC-APCI-MS/MS (15). Limit menší než $2,6 \mu\text{mol l}^{-1}$ na koloně má metoda kapalinová chromatografie s tandemovou MS využívající ionizace pomocí elektrospreje, která analyzuje sušené sérum derivatizované na pikolinylové steroly pomocí 3- β -pikolinátu (57). Jak vyplývá z předchozích řádků, v současnosti je často využívána metodika založená na nákladné MS v kombinaci s chromatografickou separací, a proto stále dochází k aktivnímu výzkumu v oblasti alternativních metod pro rutinní stanovení 7-DHC.

Jako příklad alternativního přístupu ke stanovení 7-DHC může posloužit metoda založená na *in situ* derivatizaci 7-DHC pomocí Liebermannova-Burchardova činidla (směs kyseliny sírové, octové kyseliny a anhydridu octové kyseliny), která vede k rychlé a pomíjivé změně barvy roztoku, čímž je umožněno kolorimetrické stanovení 7-DHC bez interference cholesterolu, který v tomto časovém rozsahu (jednotky sekund) zůstává bezbarvý (58). Lze očekávat, že podobně jako ve standardní metodě stanovení cholesterolu podle Abella a Kendalla (59), kde je Liebermannovo-Burchardovo činidlo využíváno, dochází k dehydrataci a dalším reakcím steroidního skeletu 7-DHC, a tím ke vzniku zabarvení (60). Pacienti trpící SLOS často vykazují sníženou hladinu cholesterolu, avšak není to pravidlem. Hodnoty koncentrace cholesterolu v plasmě mohou být navíc u těchto pacientů falešně zvýšené, protože ve většině klinických laboratoří jsou pro stanovení cholesterolu využívány testy založené na cholesterol oxidáze, která však není pro cholesterol specifická, a výsledná hodnota v sobě zahrnuje i koncentraci prekurzorů cholesterolu jako jsou 7-DHC a 8-DHC (61). S ohledem na dědičnou podstatu SLOS mohou být pro jeho diagnostiku přirozeně využívány i molekulární metody studia genu kódujícího 7-DHCR (62).

Tab. 2 Koncentrace 7-DHC v plasmě a plodové vodě u zdravých a SLOS pacientů.

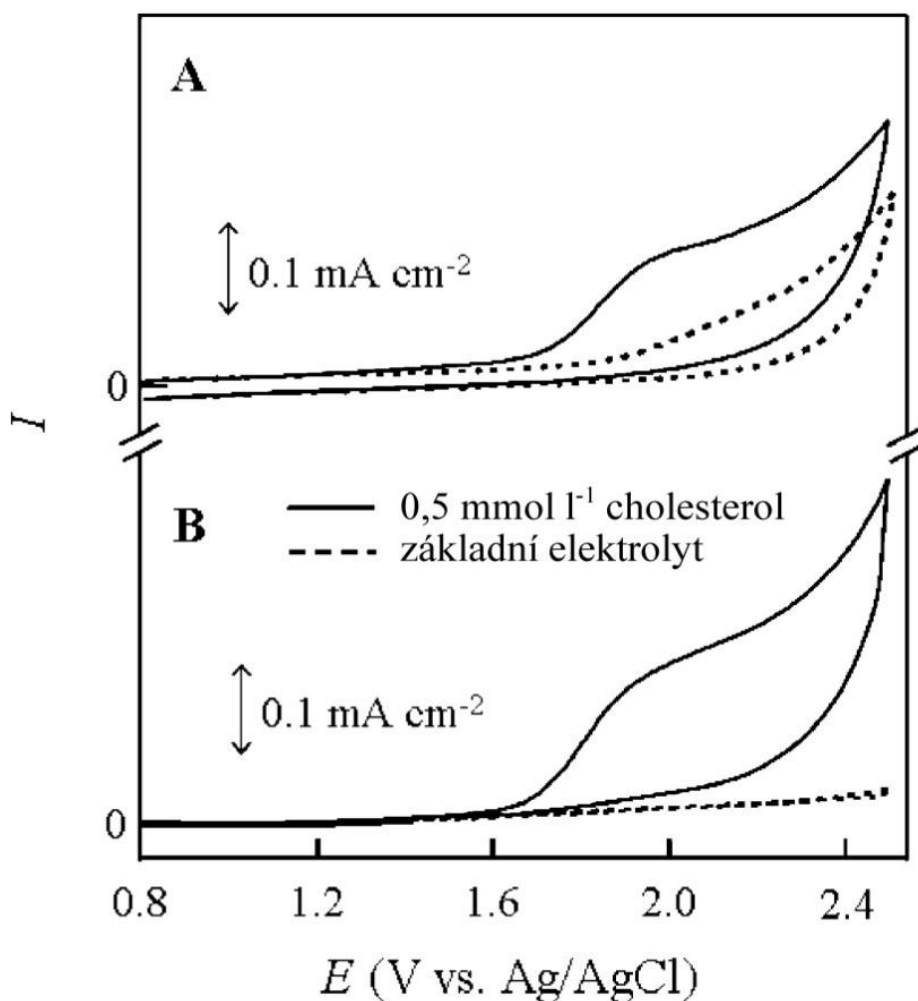
	7-DHC/zdravý ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	7-DHC/SLOS ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Reference
Plasma	<7	352	(63)
Plasma	$0,33 \pm 0,10$	385 ± 309	(47)
Plasma	$0,26 \pm 0,13$	7 – 1221	(28)
Plasma	<2,86		(62)
Plasma	0,26		(15)
Plodová voda	$0,016 \pm 0,005$	$16,3 \pm 9,10$	(47)
Plasma	0,13 – 1,30	650	(46,64)

1.3. Elektrochemické vlastnosti 7-DHC a příbuzných sterolů

Elektrochemické reakce nearomatických sterolových sloučenin nejsou častým předmětem vědeckého zájmu, neboť jejich redoxní aktivita je omezená. Přehledný článek z roku 2017 poskytuje shrnutí možností elektrochemické charakterizace a analýzy steroidních sloučenin za využití neenzymatických metod (65). Míra redoxní aktivity steroidních sloučenin závisí na počtu dvojných vazeb v jinak nereaktivním sterolovém jádře a na povaze přítomných funkčních skupin.

Obecně existují dva způsoby elektrochemické detekce sterolů. První způsob představují enzymatické biosenzory, které téměř výhradně slouží pro detekci cholesterolu. Jsou založeny na imobilizaci cholesterolové oxidázy na povrchu elektrody. Cholesterolová oxidáza katalyzuje reakci cholesterolu s kyslíkem za vzniku cholesten-3-onu a peroxidu vodíku, a proto lze cholesterol stanovit z amperometrické odezvy odpovídající poklesu redukčního proudu kyslíku nebo častěji na základě redukčního nebo oxidačního proudu peroxidu vodíku (66). Enzymatické stanovení cholesterolu je standardně používanou metodou v nemocničních laboratořích pro stanovení celkového cholesterolu, avšak nejsou specifické pro cholesterol a výsledné hodnoty zahrnují i koncentraci 7-DHC. Kvůli tomu se u pacientů trpících SLOS mohou zdát hodnoty cholesterolu v normě, třebaže 7-DHC a 8-DHC tvoří více než polovinu z naměřených hodnot. Z tohoto důvodu není enzymatické vyšetření spolehlivou metodou v diagnostice SLOS (26).

Druhý přístup je pak založen na přímé nebo nepřímé oxidaci sterolů na různých druzích elektrod a neenzymatických biosenzorech (65). Přímá i nepřímá oxidace cholesterolu začala být důkladně studována až v průběhu posledních dvou desetiletí, protože byl dlouho považován za elektrochemicky neaktivní sloučeninu (67,68). V časných studiích byla využívána nepřímá oxidace s mediátorem, který funguje jako elektrochemický katalyzátor snižující aktivační energii potřebnou k dosažení oxidace sloučeniny s vysokým oxidačním potenciálem (69). Nepřímé oxidace cholesterolu adicí na dvojnou vazbu, oxidací allylové pozice, hydroxylové skupiny nebo připojení funkční skupiny na postranní řetězec za použití celé řady mediátorů jsou shrnuty v přehledném článku Morzyckiho (67). První popis přímé oxidace cholesterolu pochází až z roku 2005, kde oxidace probíhala na platinové elektrodě v ledové kyselině octové s chloristanem a octanem sodným jako základním elektrolytem (70). Kromě platinové elektrody je cholesterol možné detekovat na BDD a elektrodě ze skelného uhlíku (GC, glassy carbon) při pozitivním potenciálu v nevodném prostředí acetonitrilu a chloristanu lithného. V práci zabývající se stanovením cholesterolu s elektrochemickou detekcí byly nejprve porovnány BDD a GC elektrody, přičemž jako pracovní elektroda byla zvolena BDD, protože oproti GC vykazovala vyšší proudovou hustotu oxidačního píku cholesterolu a zejména 10krát větší poměr signál-šum (obr. 4) (71). Nízké nabíjecí proudy získané na BDD byly připsány kompaktnímu, neporéznímu povrchu BDD elektrody s dominantní H-terminací. Metodou HPLC s elektrochemickou detekcí BDD získali L_D 0,04 pmol l⁻¹ s detekčním potenciálem +2,2 V vs. Ag/AgCl (71).



Obr. 4 Cyklické voltamogramy 0,5 mmol l⁻¹ cholesterolu s 50 mmol l⁻¹ chloristanem lithným v acetonitrilu na (A) GC a (B) BDD elektrodě. Rychlost skenu 0,02 V s⁻¹. Upraveno ze (71).

Nejvýznamnějšími žlučovými kyselinami u člověka jsou cholová kyselina a chenodeoxycholová kyselina. Do nedávné doby byly tyto žlučové kyseliny považovány za ještě méně náchylné k elektrochemické oxidaci než je cholesterol, protože neobsahují žádné dvojné vazby (65). Menší množství prací se zabývalo možnostmi elektrochemické redukce žlučových kyselin, která je umožněna přítomností karboxylové skupiny na jejich postranním řetězci (72). V nedávné studii byla popsána zajímavá metoda, která umožňuje chemickou aktivaci žlučových kyselin pro jejich elektrochemickou oxidaci (73). *In situ* aktivace žlučových kyselin je dosaženo zavedením dvojné vazby do jejich struktury pomocí dehydratační reakce s HClO₄ v acetonitrilu (analogie k Liebermannově-Burchardově reakci), která slouží zároveň jako základní elektrolyt. Tímto jednoduchým způsobem je v aktivované žlučové kyselině zvýšená elektronová

hustota, a lze provést její elektrochemickou oxidaci při $ca +1,2$ V vs. Ag/AgNO₃ v acetonitrilu. Tato metoda aktivace byla následně využita k analytickým účelům, kdy bylo metodou diferenční pulzní voltametrie (DPV) dosaženo L_D 0,5 mol l⁻¹ pro cholovou kyselinu a 1,0 mol l⁻¹ pro chenodeoxycholovou kyselinu (74).

Nepřímá anodická oxidace cholové kyseliny s chloristanem sodným jako základním elektrolytem probíhá v zásaditém prostředí na Ti/PbO₂, platinové a GC elektrodě. Tato nepřímá oxidace využívá oxidace mediátorového iontu, který vyměňuje elektron s méně elektrochemicky aktivní skupinou. Zde byl použit NaCl jako mediátorový iont pro oxidaci hydroxylových skupin kyseliny cholové, které se oxidují dle umístění na uhlíku v pořadí C7 > C12 > C3 (75). I v případě žlučových kyselin se přirozeně uplatňuje nepřímé enzymatické stanovení za pomoci elektrochemické detekce NADH nebo H₂O₂ (76–78).

Po důkladné literární rešerši byly nalezeny pouze tři vědecké práce, kde byla popsána elektrochemická oxidace 7-DHC, z toho v jedné práci byla využita pro analytické účely. První práce pochází z roku 1975 a sleduje změnu půlvolného potenciálu vitamínu A, D a 7-DHC v závislosti na pH (79). Pro tento účel zvolili prostředí methanol:voda (75:25), protože poskytovalo nejširší anodické okno a nejnižší zbytkový proud. Měření na GC ukázalo, že půlvolný potenciál pro oxidaci 7-DHC není závislý na změně pH a nachází se u $+0,84 \pm 0,03$ V vs. SCE. V tomto článku byla také studována oxidace 7-DHC s 0,05 mol l⁻¹ chloristanem lithným jako základním elektrolytem v prostředí methanol:benzen (2:1), kde 7-DHC poskytoval dobře vyvinutý pík u $+1,04$ V vs. SCE (79). Druhá publikace pochází z roku 1990 a zabývá se stanovením 7-DHC v lidské kůži za použití dvou chromatografických systémů (jednoduchá isokratická HPLC by nezajistila dostatečnou přesnost a správnost měření). Příprava vzorku vyžadovala relativně složitou předúpravu včetně extrakce a přidání ergosterolu jako vnitřního standardu. Isokratická HPLC s UV detekcí hexan-isopropanol (99:1) na koloně s normálními fázemi Spherisorb SW5, sloužila pro preparativní část, avšak nesePARovala ergosterol a 7-DHC. Jejich separaci zajistila mobilní fáze methanol-tetrahydrofuran-17,5 mmol l⁻¹ KH₂PO₄ (95:1:4) na koloně s reverzními fázemi Ultrasphere 5-μm ODS a amperometrickou detekcí. Na GC elektrodu byl vložen detekční potenciál $+1,7$ V vs. Ag/AgCl. Tato metoda měla L_D 3,9 pmol l⁻¹ (80). Ve třetí studii byl stanovován vitamín D₃ a 7-DHC v rybách metodou HPLC s elektrochemickou detekcí. Ke vzorkům byly přidány vnitřní standardy vitamínu D₂ a provitamínu D₂. Následně byl vzorek zmýdelněn hydroxidem draselným a extrahován n-hexanem. Fáze obsahující vitamín D₂/D₃ a provitamín D₂/D₃ byly dále separovány

a purifikovány na HPLC s normální fází a UV detekcí. Stanovení proběhlo na RP-HPLC a elektrochemickou detekcí realizované ve dvou celách. První cela obsahovala jednu porézní uhlíkovou elektrodu a byla umístěna mezi pumpu a injektor za účelem očištění mobilní fáze od elektroaktivních nečistot. Analytická cela se nacházela na výstupu HPLC a obsahovala dvě porézní grafitové coulometrické elektrody. Standardní coulometrická elektroda zabraňovala interferenci na elektrodě druhé. Na uhlíkovou elektrodu byl kvůli nečistotám vložen nižší potenciál +475 mV a na coulometrickou +750 mV. Elektrochemická detekce vykazovala vyšší selektivitu a citlivost než UV. Tato metoda měla lineární rozsah 0,013 – 0,312 $\mu\text{mol l}^{-1}$ korelačním koeficientem vyšším než 0,9999 (81).

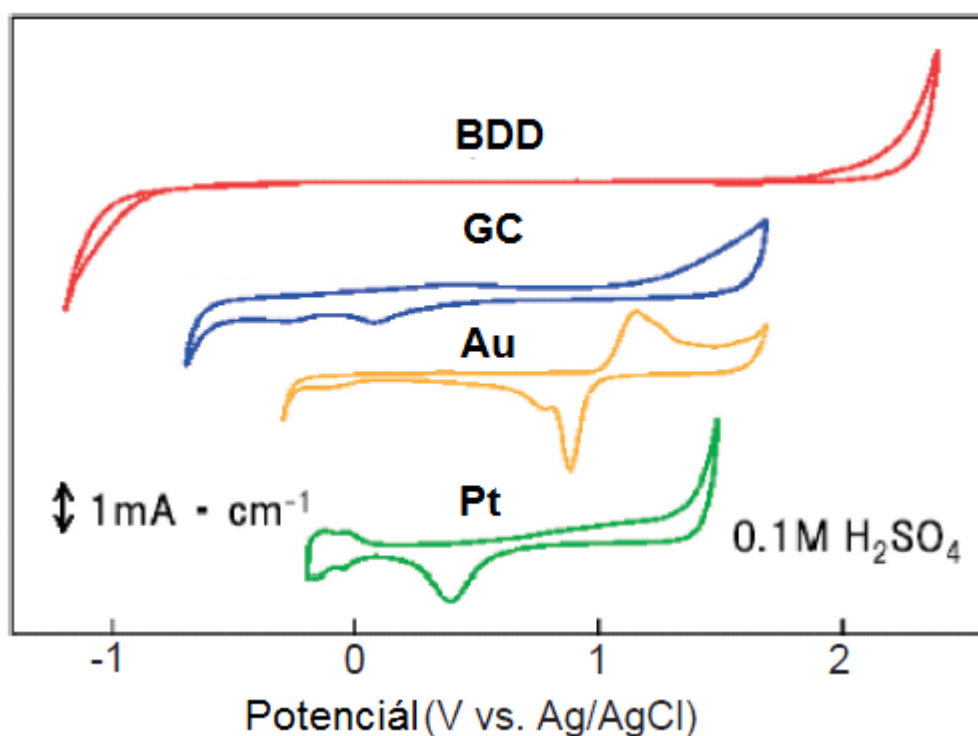
Intenzivní výzkum elektrochemických vlastností sterolů a jejich využití v elektroanalýze probíhá od roku 2013 na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy. Oxidací žlučových kyselin se zabývali Klouda (82,83) a Habániková (84). Oxidací cholesterolu se zabývaly Benešová, Bláhová a Yershova (85–87). Oxidaci fytosterolů studovali Zelenský a Jelšíková (88,89). V mé bakalářské práci byla popsána možnost elektrochemické oxidace 7-DHC a produktů jeho chemické reakce s HClO_4 (analogicky ke zmíněné aktivační reakci žlučových kyselin) s následnou aplikací pro jeho voltametrické stanovení za použití BDD elektrody v nevodném prostředí a ve směsném prostředí acetonitril-voda ($\text{ACN:H}_2\text{O}$ 95:5) (90). Tato diplomová práce dále rozvíjí možnosti elektrochemické oxidace 7-DHC ve směsném prostředí $\text{ACN:H}_2\text{O}$ a nově popisuje možnost stanovení 7-DHC v uměle připraveném séru za účelem vývoje metody postnatálního screeningu SLOS.

1.4. Bórem dopovaný diamant

Bórem dopovaný diamant (BDD) je znám od počátku 90. let 20. století (91) a od té doby se tento elektrodový materiál těší stále větší oblibě v elektrosyntézách a elektroanalýzách. Možnosti aplikace BDD elektrod v elektrochemii byly blíže studovány v 90. letech Fujishimou (91) a Swainem (92), kteří ukázali unikátní vlastnosti BDD vodivých filmů. Diamant je dobře znám jako extrémně tvrdá forma uhlíku. Je chemicky inertní s elektrickým odporem v řádu $10^{20} \Omega \text{ cm}$ a energií zakázaného pásma 5,5 eV (93). V diamantu jsou sp^3 hybridizované uhlíky vázané na 4 další uhlíky (94). Jeho vodivost je možné zvýšit dopováním bórem, přičemž míra dopování koreluje s jeho vodivostí. Jestliže je dopován bórem, získává elektrické vlastnosti polovodiče až vodiče a elektrický odpor

BDD filmu klesne na $> 0,1 \Omega \text{ cm}$ (94). Příprava těchto diamantových filmů dopovaným bórem se provádí tzv. chemickou depozicí par (CVD, chemical vapor deposition) za použití vodíku a methanu. Dopování bórem je dosaženo přidáváním diboranu do směsi plynů (95).

BDD se přibližuje ideálnímu elektrodovému materiálu pro elektroanalýzu. Mezi jeho nejvýhodnější vlastnosti patří široké potenciálové okno ve vodných prostředích, které může dosahovat až 3,5 V (obr. 5) a stabilní nízký nabíjecí proud přispívající k nižším L_D v porovnání s ostatními uhlíkatými materiály.



Obr. 5 Cyklické voltamogramy ukazující šířku potenciálových oken na různých elektrodách v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ kyseliny sírové. Upraveno z (96).

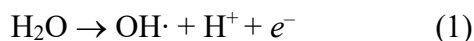
Dosavadní poznatky o přípravě, vlastnostech a aplikacích BDD filmů v organické elektroanalýze jsou shrnuty v přehledových člancích Schwarzové-Peckové (97,98). Elektrochemickými aplikacemi se zabývá review (96).

To, jaké bude mít BDD elektroda elektrochemické vlastnosti, závisí na míře dopace bórem, množství nečistot nepocházejících z diamantu a povrchové terminaci (99). Terminace BDD má významný vliv na elektrochemické vlastnosti BDD elektrod v elektroanalytických měřeních, protože je klíčovým faktorem ovlivňujícím přenos

elektronu a adsorbci organických sloučenin (97).

Metodou CVD v atmosféře vodíku se vytvoří BDD filmy terminované na povrchu vodíkem, jen jsou relativně stálé. V průběhu času, v řádu měsíců začnou podléhat samovolné oxidaci na vzduchu (100). Pomalu se mění na více hydrofilní O-terminované filmy (99). Existuje několik možností přímé přípravy O-terminovaných BDD filmů, například vystavení kyslíkové plazmě, fotochemická oxidace (101), reakce s kyslíkem za vysoké teploty (102), vaření v prostředí silné kyseliny (103,104), leštění aluminou nebo oxidace silným oxidantem. Pravděpodobně nejčastější je povrchová oxidace anodickou polarizací (105) (viz níže). Kyslíkem terminované povrchy mohou být převedeny na H-terminované, například ošetřením vodíkovou plazmou nebo vodíkovým plazmatickým žíháním (99).

Obou terminací lze docílit katodickou a anodickou předúpravou povrchu BDD elektrody. Vložením vysokého pozitivního potenciálu ($> +2$ V) nebo vysoké proudové hustoty na několik sekund až minut se povrch oxiduje. Dojde k rozkladu molekuly vody podle rovnice (1) a vzniklý hydroxylový radikál reaguje s uhlíkem na povrchu BDD (106,107).



Způsob terminace má významný vliv na fyzikálně-chemické vlastnosti BDD povrchu. O-terminované filmy mají zpravidla širší potenciálová okna. Stejně tak použitím vysokého negativního potenciálu (okolo -2 V, čili v oblasti úniku vodíku) nebo negativní proudové hustoty lze dosáhnout H-terminovaného povrchu, čímž se jednoznačně zvyšuje jeho hydrofobnost (108).

2 Experimentální část

2.1. Použité chemikálie a příprava roztoků

Studovaná látka 7-DHC (čistota 95 %), lidský sérový albumin (HSA) (čistota $\geq 97\%$), glukosa (čistota 99,5 %), močovina a acetonitril pro HPLC (čistota 99,8%) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (USA).

Ostatní použité chemikálie dosahovaly, pokud není uvedeno jinak, analytické čistoty: bezvodý chloristan sodný (Fluka), chlorid sodný (Lach-Ner, Neratovice, ČR), dihydrát chloridu vápenatého (Penta, Chrudim, ČR), chlorid draselný (Lach-Ner, Neratovice, ČR), hydroxid sodný (Penta, Chrudim, ČR), kyselina chlorovodíková (Penta, Chrudim, ČR) a alumina (velikost částic 1,1 μm , Elektrochemické detektory, Turnov).

Umělé sérum bylo připraveno navážením a rozpuštěním následujících látek v deionizované vodě; výsledné koncentrace byly 4,7 mmol l^{-1} glukosy, 2,5 mmol l^{-1} močoviny, 0,1 % HSA, 4,5 mmol l^{-1} chloridu draselného, 145 mmol l^{-1} sodného a 5 mmol l^{-1} vápenatého. Zásobní roztok umělého séra byl uchováván v lednici.

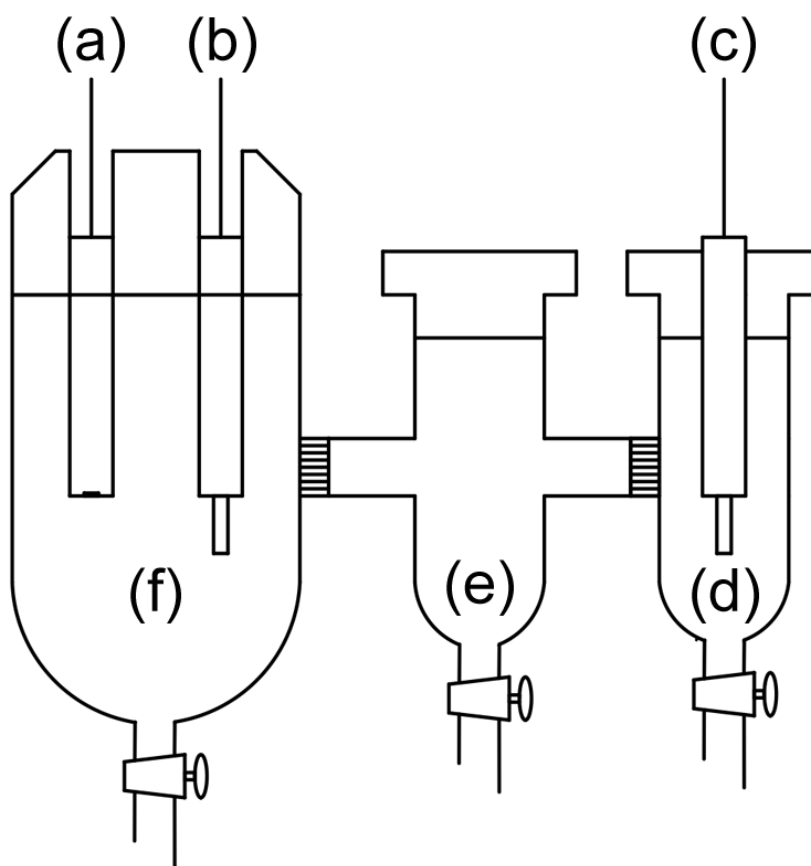
Hodnota pH v roztocích byla upravena přidavkem silné kyseliny, kterou byla kyselina chlorovodíková nebo silné zásady, hydroxidu sodného na požadované pH.

2.2. Voltametrie

Jako pracovní elektroda byla použita bórem dopovaná diamantová elektroda ($A_{\text{geom}} = 7,1 \text{ mm}^2$) od výrobce Windsor Scientific (Slough, Velká Británie). Před pořízením každé voltametrické křivky byla elektroda vyleštěna pomocí suspenze aluminy v destilované vodě, pokud nebylo uvedeno jinak.

Měření probíhala za využití běžného tříelektrodeového uspořádání s pomocnou elektrodou tvořenou platinovým drátkem (obr. 6). Jako referenční elektroda byla využita Pleskovova nevodná elektroda ($\text{Ag}/0,01 \text{ mol.l}^{-1} \text{ AgNO}_3$ v $1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaClO}_4$ v acetonitrilu). Měření probíhala na přístrojích Eco-Tribo Polarograf se softwarem Polar-Pro verze 5.1 (Eco Trend Plus, Praha), PalmSens 3 (PalmSens BV, Nizozemsko) a Autolab (Metrohm,

Nizozemsko).



Obr. 6 Elektrochemická cela, kde (a) je pracovní elektroda (BDD), (b) platinový drátek jako pomocná elektroda, (c) stříbrný drátek jako součást referenční elektrody, (d) prostor referenční elektrody obsahující $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3$ a $1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$ v acetonitrilu, (e) meziprostor obsahující $0,5 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$ v acetonitrilu a (f) pracovní prostor (82).

K měření pH hodnot byl použit digitální pH-metr s kombinovanou skleněnou elektrodou (Jenway, Essen, UK).

2.3. Stanovení 7-DHC v séru metodou standardního přídávku

Do 5ml odměrné baňky bylo napipetováno $15 \text{ } \mu\text{l}$ 7-DHC ($1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ rozpuštěno v umělém séru), $485 \text{ } \mu\text{l}$ umělého séra, a baňka byla dolita po rysku roztokem $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristanu sodného v acetonitrilu (tj. výsledný poměr ACN:H₂O 9:1). Výsledný roztok obsahoval $3 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ 7-DHC a $0,9 \text{ mol l}^{-1}$ chloristanu sodného v prostředí

acetonitril-umělé sérum 9:1 (ACN:ser 9:1). Po 5 minutách na odstředivce (rychlostí 500 RPM, typ: Chirana) byly odebrány 3 ml supernatantu, ke kterému byly postupně přidány tři přídavky 7-DHC ($1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ rozpuštěno v umělém séru) o objemu 21 μl , které odpovídaly zvýšení koncentrace o 7 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Jednotlivé koncentrace byly po vyleštění elektrody aluminou v destilované vodě, změřeny cyklickou voltametrií (CV) v rozsahu 0 až +2 V při rychlosti 0,05 V s^{-1} a následně 5 skeny metodou DPV v rozsahu 0 až +1,7 V rychlostí 0,03 V s^{-1} . Mezi každým skenem byl roztok probubláván dusíkem, za účelem obnovení povrchu elektrody.

2.4. Vyhodnocení

Výpočet L_D byl následovný: trojnásobek směrodatné odchylky hodnot proudů deseti měření pro nejmenší detekovatelnou koncentraci 7-DHC byl vydělen směnicí kalibrační křivky. Pro zpracování naměřených dat posloužily programy OriginPro 2015 (USA) a MS Excel (USA).

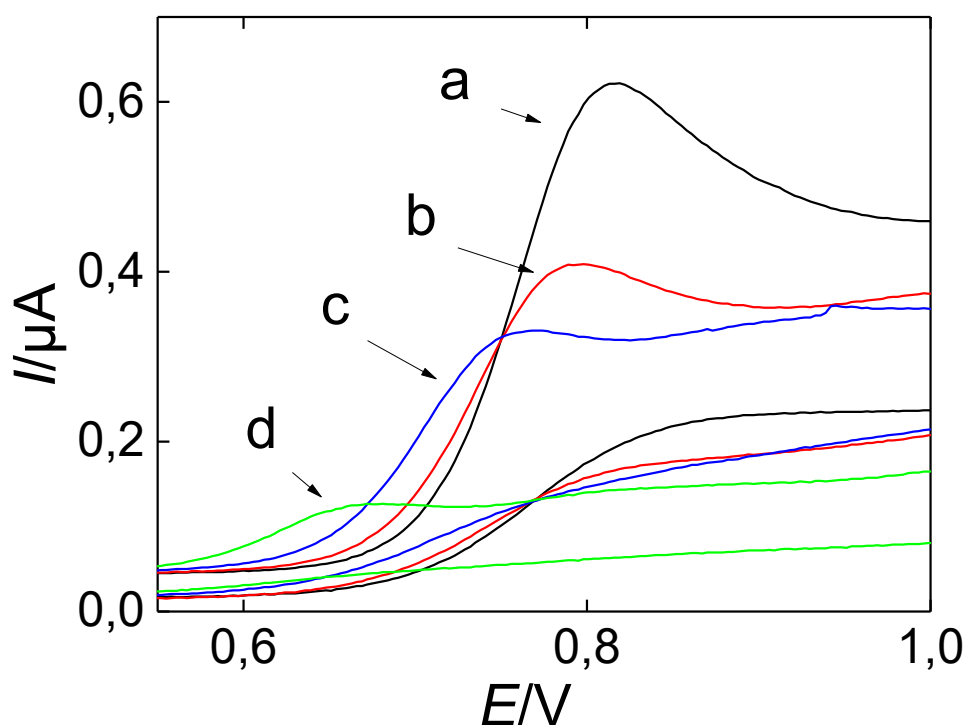
Zpracování voltametrických křivek probíhalo v programech PolarPro verze 5.1 (Eco-Trend Plus, Praha, ČR), PSTrace 5.6 (PalmSens BV, Nizozemsko) a Autolab (Metrohm, Nizozemsko).

3 Výsledky a diskuze

V této kapitole je prezentován vývoj elektroanalytické metody pro detekci 7-DHC v umělém séru. Výsledky byly získány na BDD elektrodě ve směsném prostředí acetonitril – vodná složka (voda, umělé sérum). Základním elektrolytem byl chloristan sodný nebo sole přirozeně se vyskytující v lidském séru – chlorid sodný, draselný a vápenatý. Na BDD elektrodě byl studován vliv zastoupení vodné složky a pH na elektrochemické chování 7-DHC. Pro zlepšení analytických parametrů vyvíjené metody (L_D , opakovatelnost) bylo nutné snížit komplexnost studované matrice. Toho bylo dosaženo odstraněním proteinů přítomných v umělém séru (HSA) jejich vysrážením s acetonitrem a následným odstředěním. Po optimalizaci podmínek byl 7-DHC stanoven vyvinutou metodou v umělém séru.

3.1. Vliv poměru acetonitril – vodná složka na voltametrickou odezvu 7-DHC

Biomarker SLOS, 7-DHC, je v klinické praxi stanovován zejména v krevním séru, plasmě nebo v plodové vodě. Jedná se o vodné matrice a je obecně známo, že oxidace nearomatických sterolů probíhá příznivě především v nevodném prostředí (71) případně v prostředí s minoritním obsahem vody (79). Z tohoto důvodu byl nejprve studován vliv zastoupení vodné složky na proudovou odezvu 7-DHC v prostředí acetonitril – voda s využitím $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristanu sodného jako základního elektrolytu (obr. 7). Obsah vodné složky byl měněn v rozmezí 1 – 50 %. Měření metodou cyklické voltametrie prokázala, že se potenciál píku s rostoucím zastoupením vody posouvá k méně pozitivním hodnotám (od +0,80 V pro 1 % vody k +0,66 V pro 50 % vody) a výška píku klesá (pokles o ca 80 % při zvýšení obsahu vody z 1 % na 50 %). S ohledem na citlivost metody je tedy vhodné udržovat zastoupení vodné složky na co nejnižší hodnotě. Kvůli stabilitě jsou na následujících grafech zobrazeny druhé skeny.

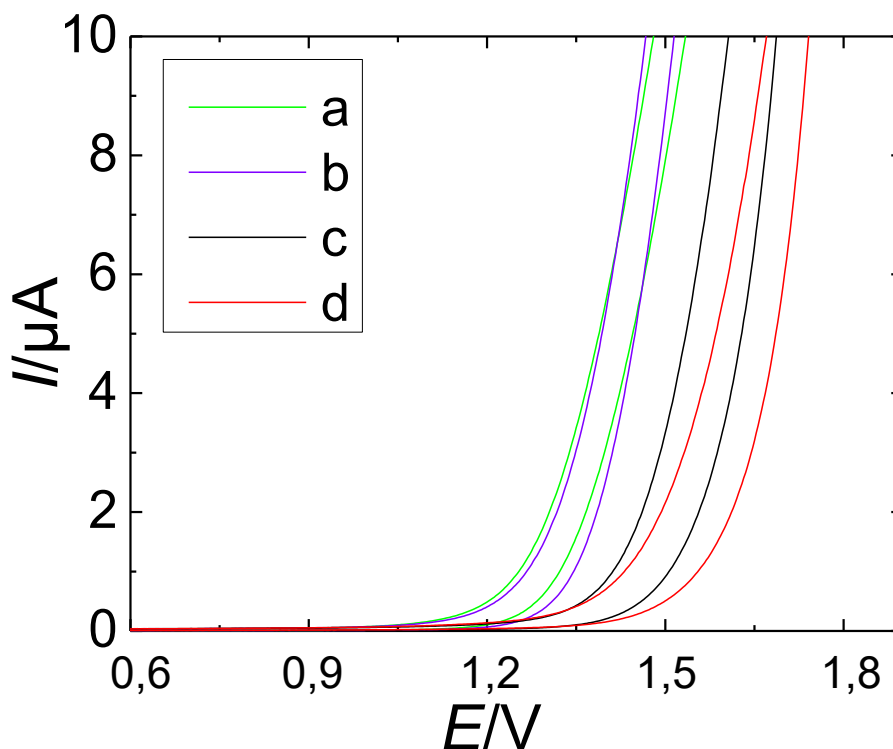


Obr. 7 Cyklické voltamogramy 7-DHC ($c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) v prostředí ACN:H₂O v poměru (a) 99:1, (b) 95:5, (c) 7:3, (d) 5:5 s chloristanem sodným ($c = 0,1 \text{ mol l}^{-1}$). Zobrazeny jsou druhé skeny. Rychlost skenu $0,05 \text{ V s}^{-1}$, měřeno v rozsahu +0,4 až +1,8 V.

Další měření byla již prováděna v přítomnosti umělého séra.

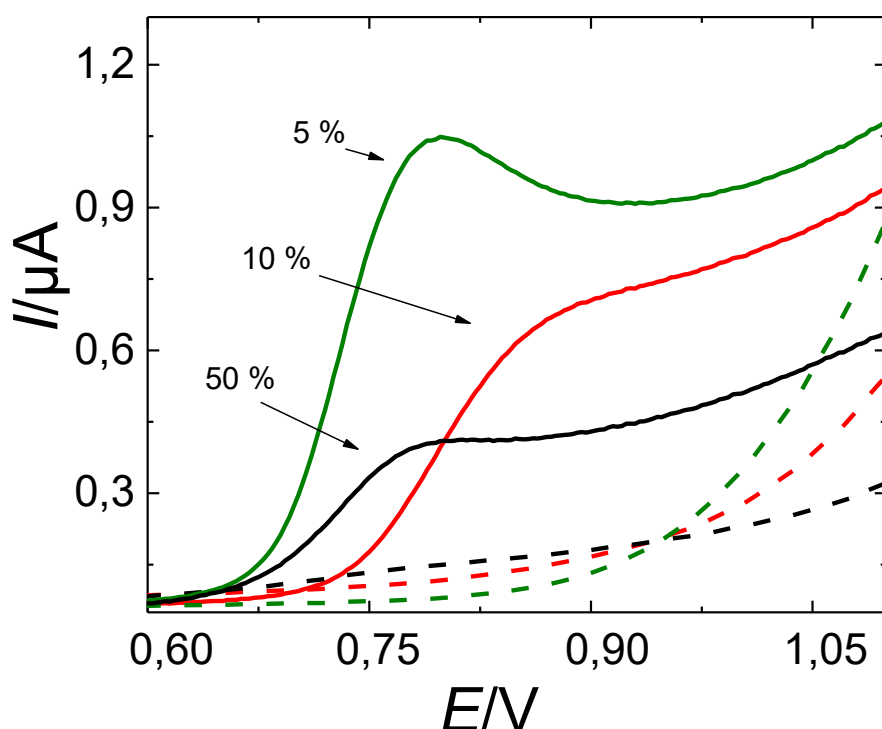
Nejprve byl studován vliv poměru ACN:ser na šíři potenciálového okna. Obecným trendem při voltametrických měřeních v prostředí acetonitrilu je, že jakýkoliv přídavek vody do studovaného roztoku má za následek zkrácení potenciálového okna v důsledku dřívějšího anodického rozkladu vody v porovnání s acetonitrilem (109). Z obr. 7 je však zřejmé, že se zvyšujícím se obsahem umělého séra (vodné složky) docházelo namísto očekávaného zkracování potenciálového okna k jeho rozšíření, přičemž nejširší bylo pro poměr ACN:ser 5:5. Tento jev je pravděpodobně zapříčiněn změnami aktivního povrchu elektrody v důsledky adsorpce HSA z umělého séra, jehož koncentrace se se zvyšujícím se obsahem umělého séra ve studovaném roztoku přirozeně také zvyšuje. V každém případě se únik základního elektrolytu pohyboval mezi +1,0 a +1,2 V, potenciálové okno bylo tedy vždy dostatečně široké pro anodickou oxidaci 7-DHC, která obvykle probíhá v rozmezí +0,6 a +0,8 V (obr. 8). Výběr optimálního zastoupení umělého séra ve studovaném roztoku

proto záleží na dalších aspektech, jako je velikost voltametrické odezvy 7-DHC a ředění vzorku séra, ve kterém je stanovovaný 7-DHC obsažen (více v následujících kapitolách).



Obr. 8 Cyklické voltamogramy naměřené v prostředí ACN:ser v poměru (a) 95:5, (b) 9:1, (c) 7:3, (d) 5:5. Rychlost skenu $0,05 \text{ V s}^{-1}$, měřeno v rozsahu +0,4 až +1,8 V.

V klinické praxi je žádoucí, aby využívané postupy byly jednoduché a nenákladné. Z tohoto důvodu byla studována odezva 7-DHC ve směsném prostředí ACN:ser bez přidané další soli jako základního elektrolytu (eliminace nadbytečné chemikálie). V tomto případě byly jako základní elektrolyt využity soli přirozeně se vyskytující v umělém séru – chlorid sodný, draselný a vápenatý. Na obr. 9 jsou zobrazeny cklcké voltamogramy 7-DHC o stejné koncentraci v prostředí s odlišným poměrem ACN:ser. Byl pozorován rozdíl ve výšce i poloze píku. K poklesu signálu 7-DHC docházelo se zvyšujícím se zastoupení umělého séra. Nejvyššího signálu bylo dosaženo při zastoupení umělého séra 5 %, proto bylo toto prostředí zvoleno pro další experimenty, popsané v následujících dvou kapitolách.

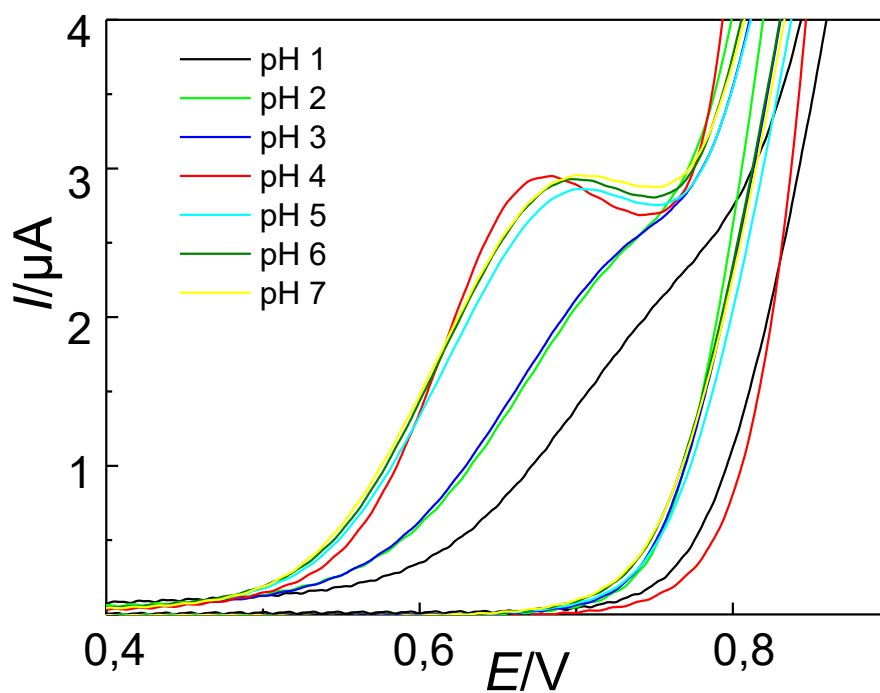


Obr. 9 Cyklické voltamogramy 7-DHC ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) v prostředí ACN:ser v poměru 95:5, 9:1 a 5:5. Zobrazeny jsou druhé skeny. Rychlost skenu $0,05 \text{ V s}^{-1}$, měřeno v rozsahu +0,4 až +1,8 V. Základní elektrolyty jsou zobrazeny čárkovaně.

3.2. Vliv pH na voltametrickou odezvu 7-DHC

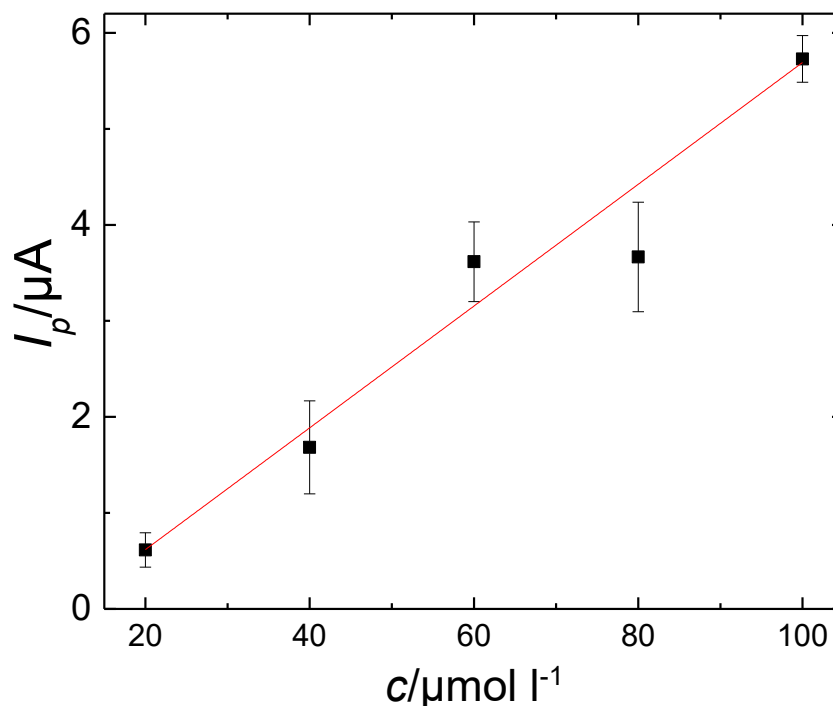
Hodnota pH má ve voltametrických měřeních často zásadní vliv na průběh proudové odezvy oxidovatelných analytů. Z tohoto důvodu byl studován vliv pH na voltametrické chování 7-DHC v prostředí umělého séra. Molekula 7-DHC neobsahuje žádné skupiny jednoduše podléhající (de)protonizaci, avšak jednou ze složek umělého séra je HSA, který obsahuje aminokyseliny, které mohou být (de)protonizovány v závislosti na pH roztoku. Voltametrická odezva 7-DHC ve směsném prostředí ACN:ser 95:5 byla studována metodou CV v rozsahu pH 1,0 – 7,0 (hodnota pH nativního séra 4 ± 3). Ze získaných voltamogramů (obr. 10) je patrné, že v prostředí, které bylo relativně k nativnímu séru kyselé (pH 1,0 – 3,0) jsou voltamogramy špatně vyvinuté a poskytují pouze náznak píku okolo +0,70 V, případně +0,75 V při pH 1,0. Změna průběhu voltametrické odezvy může souviset jednak s protonizací karboxylových skupin přítomných v aminokyselinách tvořících HSA a interakcí těchto proteinů s povrchem elektrody, jednak s mechanismem oxidace 7-DHC. Z analytického hlediska je dosaženo vhodné odezvy 7-DHC v mírně

kyselém až neutrálním prostředí (rozmezí pH 4,1–7,0), kde je přítomen dobře vyvinutý pík při potenciálech *ca* +0,70 V. Nativní umělé sérum má hodnotu pH 4,1 a pro další měření tedy nebyla nutná jeho úprava.



Obr. 10 Cyklické voltamogramy 7-DHC ($c = 8 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) ve smíšeném prostředí ACN:ser v poměru 95:5 v rozmezí pH 1,0 – 7,0. Zobrazeny druhé skeny.

3.3. Koncentrační závislost v prostředí umělé sérum – acetonitril (5:95)

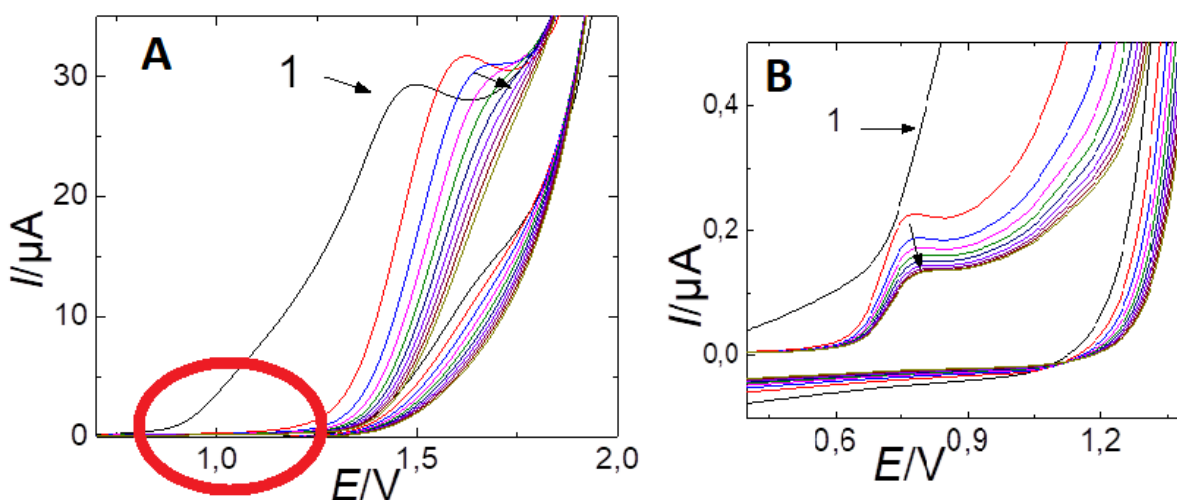


Obr. 11 Koncentrační závislost 7-DHC ve směsném prostředí ACN:ser v poměru 95:5. Koncentrace 7-DHC ($\mu\text{mol l}^{-1}$): 20, 40, 60, 80, 100. Chybové úsečky odpovídají hodnotě směrodatné odchylky pro pět měření.

Na základě výsledků získaných v průběhu optimalizačního procesu byla v prostředí ACN:ser 95:5 bez úpravy pH (nativní pH = 4,1) sestrojena koncentrační závislost 7-DHC. Tato závislost byla získána pomocí DPV, jejíž parametry byly optimalizovány na roztoku 7-DHC o koncentraci $100 \mu\text{mol l}^{-1}$. Následující parametry byly zvoleny jako optimální: výška pulzu 0,1 V; potenciál kroku 0,01 V; šířka pulzu 0,01 s a rychlost skenu $0,05 \text{ V s}^{-1}$. Na elektrodu, která byla mezi každým měřením leštěna pomocí suspenze aluminy v destilované vodě, byl aplikován potenciálový rozsah +0,2 až +0,8 V. Za těchto podmínek proběhla měření v koncentračním rozmezí $1 - 100 \mu\text{mol l}^{-1}$, přičemž nejnižší koncentrace, při níž 7-DHC poskytoval signál, byla $20 \mu\text{mol l}^{-1}$. Každý kalibrační bod byl změřen pětkrát, ten nejnižší viditelný ($20 \mu\text{mol l}^{-1}$) pak desetkrát (pro účely výpočtu L_D). Koncentrační závislost, která byla sestavena z průměru měření a proložena přímkou je

zobrazena na obr. 11. Signál roztoků 7-DHC s $c < 20 \mu\text{mol l}^{-1}$ se kryje se signálem základního elektrolytu. V tomto případě je L_D $8,9 \mu\text{mol l}^{-1}$, což odpovídá koncentraci $178 \mu\text{mol l}^{-1}$ 7-DHC v séru před ředěním acetonitrilem. Při porovnání tohoto L_D s fyziologickými a patologickými hodnotami 7-DHC v biologických matricích (tab.2) lze konstatovat, že pro analýzu krevní plasmy je L_D příliš vysoký a metodu je tedy nutno dále optimalizovat.

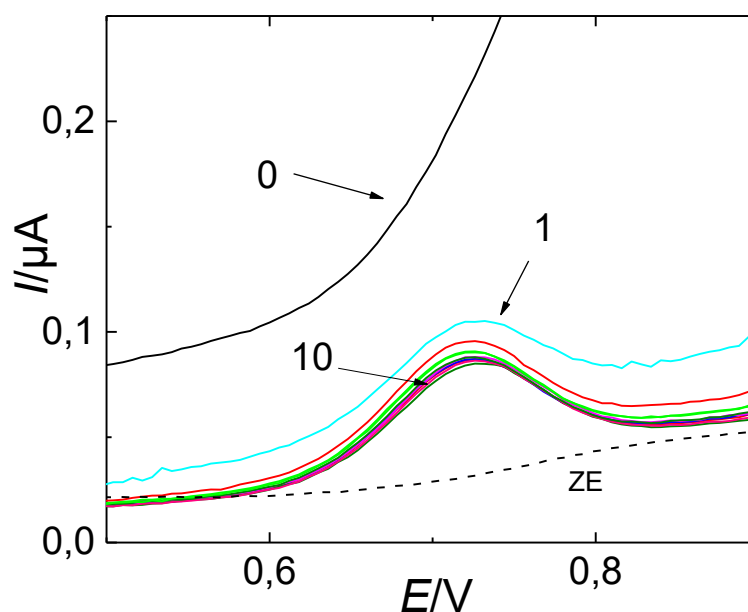
3.4. Zjednodušení matrice – vysrážení proteinů



Obr. 12 (A) Cyklické voltamogramy 7-DHC ($c = 2,25 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) v prostředí ACN:ser v poměru 95:5 s chloristanem sodným ($c = 0,95 \text{ mol l}^{-1}$). Deset následných cyklů, rychlost skenu $0,05 \text{ V s}^{-1}$, měřeno v rozsahu $+0,4$ až $+2,0 \text{ V}$. (B) Přiblížené rozmezí potenciálů od $+0,4$ do $+1,4 \text{ V}$.

Je zřejmé, že přímočarý postup založený na pouhém smíšení vzorku umělého séra a acetonitrilu je prakticky nepoužitelný kvůli vysokému L_D . Na základě experimentů provedených v rámci mé bakalářské práce bylo zjištěno, že v prostředí acetonitrilu lze dosáhnout L_D $0,19 \mu\text{mol l}^{-1}$ a ve směsném prostředí ACN:H₂O v poměru 95:5 $0,24 \mu\text{mol l}^{-1}$ (90). Tyto hodnoty L_D jsou pro vývoj elektroanalytické metody zaměřené na *screening* SLOS atraktivní. Z tohoto důvodu byl do vyvíjeného analytického postupu zařazen krok, který měl za cíl výrazně zjednodušit studovanou matici a tím se přiblížit L_D popsaným za ideálních podmínek (90). Tento krok se skládal z vysrážení HSA pomocí přídavku acetonitrilu a následným odstředěním roztoků při 500 RPM. Vysrážením proteinů ze séra dojde ke zjednodušení matrice. Pro další měření byl do roztoku přidáván chloristan sodný pro zaručení nadbytku základního elektrolytu.

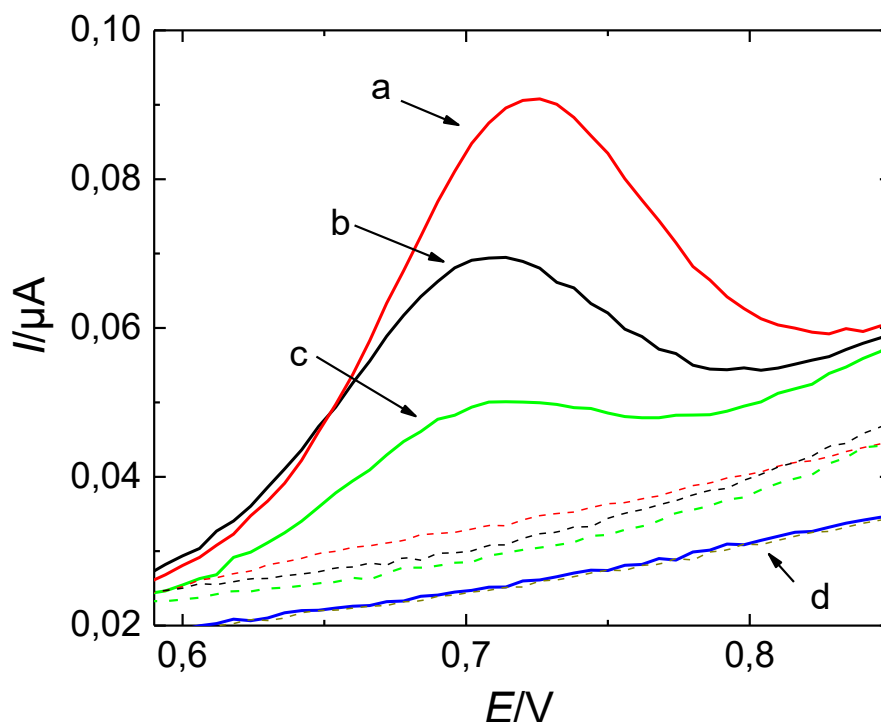
Po odstředění byl získaný supernatant studován pomocí CV. Na obr. 12 je zřejmé, že první cyklický voltamogram je výrazně odlišný od následujících. Je na něm patrný pouze jeden voltameterický pík přítomný při *ca* +1,5 V, narozdíl od následných skenů, kdy je přítomen dobře vyvinutý signál 7-DHC u +0,77 V. Voltametrické chování stejného roztoku bylo studováno metodou DPV. Křivka, která je na obr. 13 označena 0, byla změřena DPV bezprostředně po vyleštění elektrody za pomoci suspenze aluminy v destilované vodě a není na ní patrný signál u potenciálu, který odpovídá oxidaci 7-DHC. Na základě předchozích CV experimentů bylo zřejmé, že je nutné povrch elektrody elektrochemicky předpřipravit, jelikož signál 7-DHC se objevoval až od druhého skenu. To bylo realizováno tak, že po vyleštění byla elektroda jednou cyklována rozsahu 0 až +2,0 V již přímo v měřeném roztoku a následně mohly být zaznamenány DP voltamogramy v rozmezí +0,4 až +2,0 V s jasně zřetelným píkem 7-DHC při *ca* +0,73 V (zbylé křivky na obr. 13). Pro obnovení povrchu elektrody byl roztok mezi každým skenem probubláván dusíkem.



Obr. 13 DP voltamogramy 7-DHC ($c = 2,25 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) pro deset následných skenů v prostředí ACN:ser 95:5 s chloristanem sodným ($c = 0,95 \text{ mol l}^{-1}$). Rychlost skenu $0,05 \text{ V s}^{-1}$, měřeno v rozsahu +0,4 až +2,0 V.

Za identických podmínek (odstranění proteinů, předpříprava elektrody pomocí CV) byl metodou DPV studován roztok 7-DHC v prostředí chloristanu sodného s různými poměry ACN:ser 95:5, 9:1, 8:2 a 7:3. Zaznamenané DP voltamogramy jsou zobrazeny na obr. 14

a shrnutí opakovatelnosti proudové odezvy pro deset měření je uvedeno v tab. 3. Hodnoty proudové odezvy pro ACN:ser 7:3 nejsou v tabulce uvedeny, jelikož se jejich odezva překrývala s křivkou základního elektrolytu (patrné na obr. 14). Pokles opět bude souviset s mechanismem oxidace 7-DHC. Při volbě vhodného prostředí pro stanovení 7-DHC v reálných matricích je klíčovým faktorem míra zředění vzorku. Jak je patrné z tab. 2, v případě onemocnění SLOS vzroste koncentrace 7-DHC v plasmě řádově stokrát na stovky až tisíce mikromolů na litr. Pro předběžné vyšetření pacientů s podezřením na SLOS není tedy třeba využívat metody s extrémně nízkým L_D . Avšak zároveň je zřejmé, že pro potřeby prezentované metody je nutné umělé sérum zředit $5\times$ až $20\times$, a hodnoty L_D musí být tedy výrazně nižší, než je koncentrace 7-DHC v plasmě pacientů trpících SLOS. Z obr. 14 a tab. 3 je patrné, že se zvyšujícím se zastoupením vodné složky ve studovaných roztocích klesá proudová odezva 7-DHC (přičemž pro ACN:ser 7:3 již kompletně mizí) a naopak roste relativní směrodatná odchylka (RSD). Předpokladem pro klesání signálu může být . V prostředí ACN:ser 8:2 byl signál již velmi nestabilní (RSD = 32,9 %) a křivky nebylo vždy jednoduché vyhodnotit, je tedy jasné, že se nejedná o vhodné prostředí pro stanovení 7-DHC. V prostředí ACN:ser 95:5 byla získána nejvyšší proudová odezva a zároveň byl signál velmi stabilní (RSD = 2,0 %), avšak vzorek umělého séra je v tomto případě výrazně zředěný ($20\times$). Naopak signál 7-DHC v prostředí ACN:ser 9:1 dosahuje při relativně rozumném ředění ($10\times$) 58 % signálu získaného v prostředí ACN:ser 95:5, kde dochází k dvounásobně vyššímu zředění vzorku séra ($20\times$). I při zahrnutí vyšší variability ve výsledcích (RSD = 9,2 %) bylo v prostředí ACN:ser 9:1 dosaženo nejvyšší relativní proudové odezvy vzhledem k naředění vzorku. Toto prostředí bylo tedy zvoleno jako nejvhodnější pro další experimenty.



Obr. 14 DP voltamogramy 7-DHC ($c = 2,25 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) pro deset následných skenů v prostředí ACN:ser (a) 95:5, (b) 9:1, (c) 8:2, (d) 7:3 s chloristanem sodným ($c = 0,95 \text{ mol l}^{-1}$). Zobrazeny druhé skeny. Rychlost skenu $0,05 \text{ V s}^{-1}$, měřeno v rozsahu +0,4 až +2,0 V. Základní elektrolyty jsou zobrazeny čárkovaně.

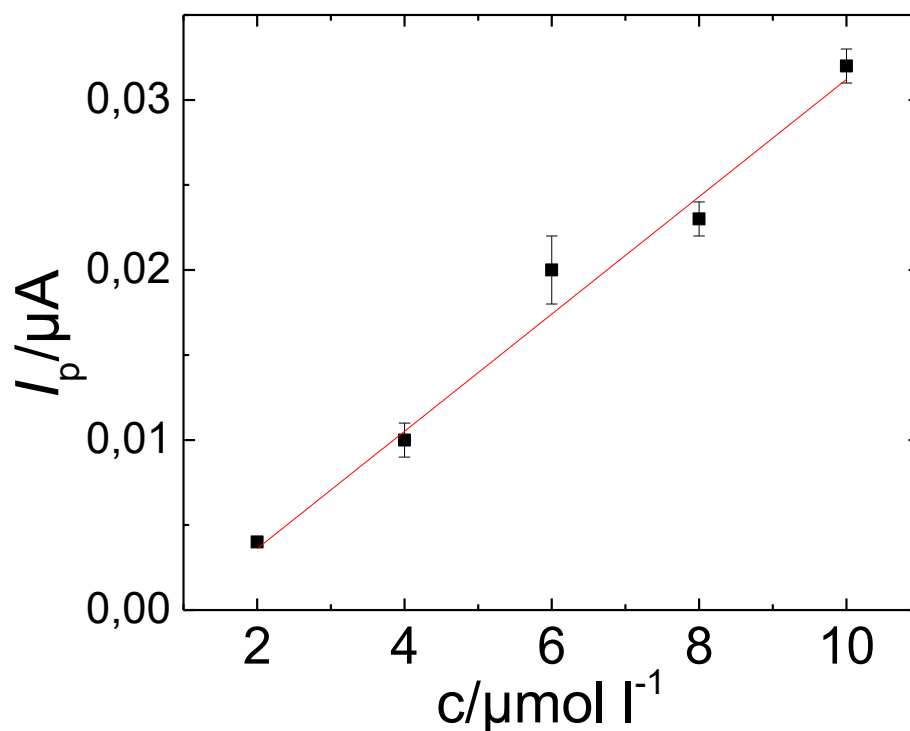
Tab. 3 Průměrné výšky píků a jejich směrodatné odchylky pro 7-DHC v prostředí ACN:ser 95:5, 9:1, 8:2 s chloristanem sodným ($c = 0,95 \text{ mol l}^{-1}$).

	$I_p/\mu\text{A}$		
	5%	10%	20%
n	10	10	6
\bar{x}	0.045	0.026	0.012
s	0,001	0,002	0,004
s_r (%)	2,0	9,2	32,9

3.5. Koncentrační závislost v prostředí acetonitril – sérum 90:10 po vysrážení proteinů

Pro snížení nepřiměřené vysokého L_D popsaného v kapitole 3.3. byl použit postup odstranění proteinů za pomoci jejich vysrážení a následného odstředění roztoku popsaný

v předchozí kapitole. Jako nejvhodnější pro voltametrické stanovení 7-DHC bylo použito směsné prostředí ACN:ser 9:1 s využitím chloristanu sodného. Koncentrační závislost byla získána metodou DPV v rozsahu 0 až +1,7 V za optimalizovaných podmínek (šířka 0,1 s; výška 0,05 V; potenciál kroku 0,006 V s rychlostí skenu 0,03 V s⁻¹). Na základě analytických parametrů metody shrnutých v tab. 4 je patrné, že oproti postupu popsánému v kapitole 3.3. (L_D před zředěním 178 $\mu\text{mol l}^{-1}$) došlo k více než 100× snížení L_D na 0,2 $\mu\text{mol l}^{-1}$ pro prostředí ACN:ser 9:1, což odpovídá 1,5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ v séru před zředěním vzorku acetonitrilem. Při pohledu na hodnoty uvedené v tab. 2 je zřejmé, že takovýto L_D je dostatečný pro klinické využití prezentované metody.



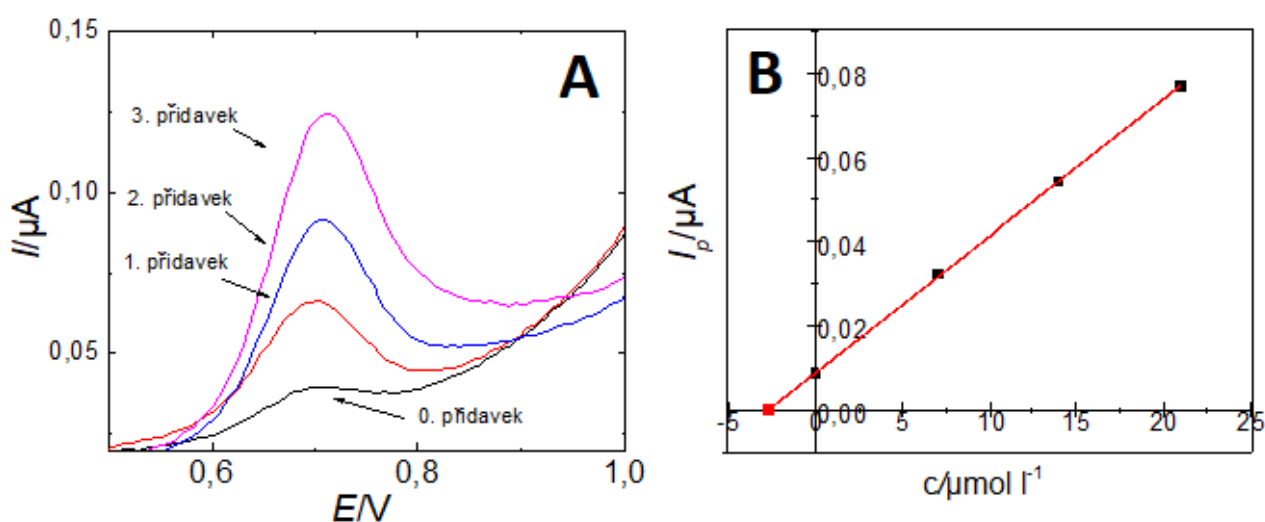
Obr. 15 Koncentrační závislost 7-DHC v prostředí ACN:ser 9:1 s chloristanem sodným ($c = 0,9 \text{ mol l}^{-1}$). Koncentrace 7-DHC ($\mu\text{mol l}^{-1}$): 2, 4, 6, 8, 10. Chybové úsečky odpovídají hodnotě směrodatné odchylky pro pět měření.

Tab. 4 Parametry kalibračních závislostí s L_D získaných metodou DPV na BDDE.

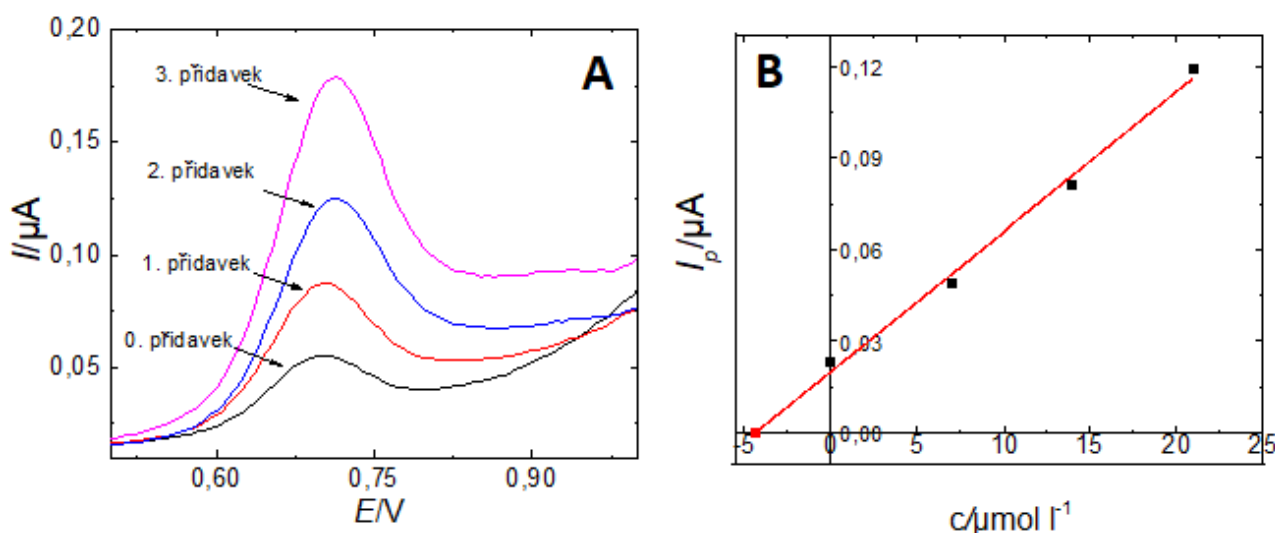
ACN:ser	úsek (μA)	směrnice ($\mu\text{A } \mu\text{mol l}^{-1}$)	R^2	L_D ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	L_D 100 % ($\mu\text{mol l}^{-1}$)
95:5 bez eliminace HSA	$-0,601 \pm 0,529$	$0,061 \pm 0,008$	0,9350	8,9	178
9:1 s NaClO_4 a eliminací HSA	$-0,003 \pm 0,001$	$0,003 \pm 0,000$	0,9877	0,2	1,5

3.6. Stanovení 7-DHC metodou standardního přídavku

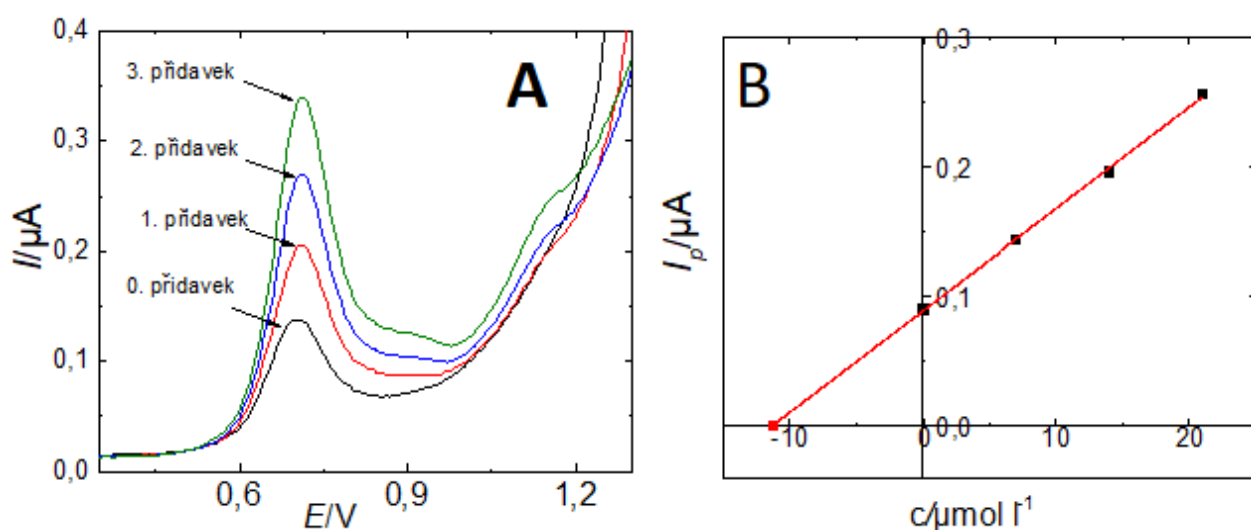
Za identických podmínek jako v předchozí kapitole byla metodou standardního přídavku stanovena koncentrace tří modelových vzorků umělého séra obsahujících koncentrace 7-DHC 30, 100 a 250 $\mu\text{mol l}^{-1}$, což odpovídá 3, 10, 25 $\mu\text{mol l}^{-1}$ po zředění (ACN:ser 9:1). K těmto vzorkům byly přidány celkem tři standardní přídavky odpovídající nárůstu koncentrace o 7 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Na následujících grafech jsou zobrazeny výšky píků jednotlivých přídavků, které odpovídají průměru pro 10 měření.



Obr. 16 Metoda standardního přídavku 7-DHC ($c = 3 \mu\text{mol l}^{-1}$) s třemi standardními přídavky ($c = 10, 17, 24 \mu\text{mol l}^{-1}$) v prostředí chloristanu sodného ($c = 0,9 \text{ mol l}^{-1}$) ve směsném prostředí ACN:ser 9:1. (A) DP voltamogramy, (B) koncentrační závislost výšky píků přídavků.



Obr. 17 Metoda standardního přidavku 7-DHC ($c = 10\ \mu mol\ l^{-1}$) s třemi standardními přidavky ($c = 17, 24, 31\ \mu mol\ l^{-1}$) v prostředí chloristanu sodného ($c = 0,9\ mol\ l^{-1}$) ve směsném prostředí ACN:ser 9:1. (A) DP voltamogramy, (B) koncentrační závislost výšky píků přidavků.



Obr. 18 Metoda standardního přidavku 7-DHC ($c = 25\ \mu mol\ l^{-1}$) s třemi standardními přidavky ($c = 32, 39, 46\ \mu mol\ l^{-1}$) v prostředí chloristanu sodného ($c = 0,9\ mol\ l^{-1}$) ve směsném prostředí ACN:ser 9:1. (A) DP voltamogramy, (B) koncentrační závislost výšky píků přidavků.

Na obr. 18 si u vyšších koncentracích lze povšimnout vzniku adsorbční *post* vlny odpovídající pravděpodobně oxidaci adsorbované studované látky, která probíhá při pozitivnějších potenciálech nežli oxidace volných molekul, protože musí být dodána

energie potřebná k jejich desorpci. To znamená, že plocha píku 7-DHC může být o tuto *post* vlnu nižší.

Tab. 5 Hodnoty koncentrace 7-DHC zjištěné metodou standardního přídatku v prostředí ACN:ser 9:1 s 0,9 mol l⁻¹ chloristanem sodným a hodnoty koncentrace 7-DHC přidaného do studovaných roztoků.

Přidaná <i>c</i> 7-DHC (μmol l ⁻¹)	3	10	25
Nalezená <i>c</i> 7-DHC (μmol l ⁻¹)	2,1	4,3	11,2
Výtěžnost (%)	70	43	45
Pearsonův <i>r</i>	0,9998	0,9946	0,9995

Koncentrace získané metodou standardního přídatku jsou shrnuty v tab. 5 a je patrné, že dosahují výrazně nižších hodnot oproti množství přidaného 7-DHC, především pak pro koncentrace 10 μmol l⁻¹ a 25 μmol l⁻¹ (výtěžnost metody okolo 45 %). Snížená výtěžnost metody může být způsobena předúpravou vzorku. Zdá se pravděpodobné, že k tomuto z analytického hlediska negativnímu jevu dochází z důvodu adsorpce části 7-DHC na HSA, který je následně odstraněn odstředěním. V tomto případě lze navrhnout dvě řešení: (i) roztoky se standardním přídatkem lze podrobit stejnému postupu odstranění proteinů jako stanovovaný vzorek, a tím snížit jejich koncentraci 7-DHC. To povede k nižší hodnotě směrnice takovéto závislosti při zachování téměř konstantní hodnoty úseku, tedy na jedné straně vyšší výtěžnosti, na straně druhé však dojde ke snížení citlivosti metody. (ii) Druhou možností je volba odlišného postupu zjednodušení matrice, ve které stanovení 7-DHC probíhá, jako je například využití jednoduché extrakce na pevné fázi, preferenčně za využití C18 stacionární fáze. Zařazení extrakčního kroku bude mít však negativní dopad na přímočarost metody, v níž je v prezentované podobě elegantně využito přídatku acetonitrilu plnicího dvojí funkci: slouží jak jako rozpouštědlo umožňující elektrochemickou oxidaci 7-DHC, tak i srážecí faktor umožňující pomocí eliminace HSA výrazné zjednodušení matrice, a tím zásadní snížení *L_D* metody (178 μmol l⁻¹ bez eliminace HSA; 1,5 μmol l⁻¹ s eliminací). Velmi dobré regresní parametry všech tří koncentračních závislostí (>0,99) (tab. 5) naznačují, že za daných podmínek je elektrochemická detekce spolehlivá a pozornost by měla být věnována především ztrátám vzniklým při eliminaci HSA.

4 Závěr

Tato diplomová práce si kladla za cíl vyvinout elektroanalytickou metodu pro stanovení 7-DHC, biomarkeru dědičného onemocnění SLOS, v umělém séru. Pro studium přímé elektrochemické oxidace 7-DHC byla použita CV a DPV. Jako elektrodový materiál pro oxidace byl díky svým příznivým vlastnostem zvolen BDD.

Nejprve byl studován vliv obsahu vody a umělého séra na výšku oxidačního signálu 7-DHC a šířku potenciálového okna v prostředí acetonitrilu. Z měření vyplynulo, že s vyšším obsahem vody se oxidační signál 7-DHC snižoval a posouval se k nižším potenciálům. Pokles signálu 7-DHC ve vyšším zastoupení vody v roztoku mohl být pravděpodobně způsoben nukleofilní reakcí vody s radikálovým kationtem, který vznikl v prvním kroku mechanismu oxidace 7-DHC po vytržení elektronu z dvojné vazby. Při přidávku umělého séra došlo paradoxně k rozšíření potenciálového okna.

Odlišný průběh voltametrického signálu 7-DHC v závislosti na pH umělého séra může nejspíše souviset s mechanismem oxidace 7-DHC. Optimální pH prostředí pro oxidaci 7-DHC, ve kterém bylo měřeno, se nachází v rozmezí pH hodnot 4,0 až 7,0.

V prostředí ACN:ser 95:5 s optimalizovanými podmínky, byla naměřena koncentrační závislost 7-DHC s L_D 8,9 $\mu\text{mol l}^{-1}$, který v nezředěném séru odpovídá 178 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Tento L_D byl pro zamýšlené účely postnatálního screeningu SLOS příliš vysoký a byla potřeba jej snížit. Vliv proteinů z umělého séra, který byl příčinou vysokého limitu, byl z měřeného roztoku odstraněn vysrážením acetonitrilu s jejich následným odstředěním. Pro roztok upravený uvedeným postupem byla naměřena kalibrační závislost v prostředí ACN:ser 9:1 s použitím chloristanu sodého jako základního elektrolytu. Podniknuté kroky pomohly docílit snížení L_D na 0,2 $\mu\text{mol l}^{-1}$, což ve 100 % séru odpovídá 1,5 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Více než 100× snížený L_D je v porovnání s hodnotami v tab. 2 dostatečně nízký pro screening SLOS.

Metodou standardního přidavku byla stanovena koncentrace tří modelových vzorků. K nim byly přidávány celkem tři přidavky 7-DHC o koncentraci 7 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Spočítané koncentrace byly oproti přidaným koncentracím 30, 100, 250 $\mu\text{mol l}^{-1}$ nižší a odpovídaly 27, 43 a 112 $\mu\text{mol l}^{-1}$ 7-DHC v nezředěném séru. Za nižší výtežnost, která se pohybovala od 43 % do 70 %, byla nejspíše zodpovědná předúprava vzorku. Při srážení proteinů docházelo ke ztrátě 7-DHC, jehož část se adsorbovala na HSA, který byl odstředěním odstraněn.

I přes nedostatky, které neumožňují okamžitý přenos prezentované metody do klinické

praxe, lze konstatovat, že zde popsané výsledky poslouží jako *proof of concept* inovativního přístupu ke stanovení 7-DHC. Došlo k identifikaci kroku velmi pravděpodobně zodpovědného za sníženou výtěžnost metody a jako podnět pro další výzkum v této oblasti byla navržena dvě řešení, která mohou mít výrazný pozitivní dopad na další vývoj elektroanalytického stanovení 7-DHC. Pozornost by v budoucnosti měla být věnována také stanovení 7-DHC v plodové vodě pro účely prenatálního screeningu SLOS. Koncentrace 7-DHC v plodové vodě jsou výrazně nižší než v séru (tab. 2), proto se bude jednat o úkol kladoucí zvýšené nároky na citlivost a L_D vyvíjené metody. O atraktivitě v této diplomové práci popsaného přístupu ke stanovení 7-DHC jistě svědčí i to, že zde popsané výsledky slouží jako podklad pro další intenzivní práci na tomto tématu na mém domovském pracovišti.

Použitá literatura

1. Smith, D.W.; Lemli, L.; Opitz, J.M.: A newly recognized syndrome of multiple congenital anomalies. *J. Pediatr.* **64**, 210–217 (1964).
2. Fine, R.N.; Gwinn, J.L.; Young, E.F.: Smith-Lemli-Opitz Syndrome: Radiologic and Postmortem Findings. *Am. J. Dis. Child* **115**, 483–488 (1968).
3. Cotlier, E.; Rice, P.: Cataracts in the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am. J. Ophthalmol.* **72**, 955–959 (1971).
4. Curry, C.J.R.; Carey, J.C.; Holland, J.S.; Chopra, D.; Fineman, R.; Golabi, M.: Smith-Lemli-Opitz syndrome-Type II, multiple congenital anomalies with male pseudohermaphroditism and frequent early lethality. *Am. J. Med. Genet.* **26**, 45–57 (1987).
5. Irons, M.; Elias, E.R.; Salen, G.; Tint, G.; Batta A. K.: Defective cholesterol biosynthesis in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *N. Engl. J. Med.* **341**, 1414 (1993).
6. Tint, G.S.; Irons, M.; Elias, E.R.; Batta, A.K.; Frieden, R.; Chen, T.S.: Defective Cholesterol Biosynthesis Associated with the Smith-Lemli-Opitz Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **330**, 107–113 (1994).
7. Correa-Cerro, L.S.; Porter, F.D.: 3β -Hydroxysterol Δ^7 -reductase and the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Mol. Genet. Metab.* **84**, 112–126 (2005).
8. Kandutsch, A. A.; Russel, A.: Intermediates in a pathway from lanosterol to cholesterol. *J. Biol. Chem.* **235**, 231–234 (1960).
9. Batta, A.K.; Tint, G.S.; Shefer, S.; Abuelo, D.; Salen, G.: (cholesta-5,8-dien- 3β -ol) in patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome. **36**, 705–713 (1995).
10. Yeagle, P.L.: Cholesterol and the cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta – Rev Biomembr.* **822**, 267–287 (1985).

11. Saher, G.; Stumpf, S.K.: Cholesterol in myelin biogenesis and hypomyelinating disorders. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell. Biol. Lipids* **1851**, 1083–1094 (2015).
12. Hofmann, F.; Hagey, L.R.: Bile acids: Chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 2461–2483 (2008).
13. Beato, M.: Gene Regulation by Steroid Hormones. *Gene Expr.* 43–75 (1993).
14. Porter, F.D.; Herman, G.E.: Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis. *J. Lipid. Res.* **52**, 6–34 (2011).
15. Liu, W.; Xu, L.; Lamberson, C.; Haas, D.; Korade, Z.; Porter, N.A.: A highly sensitive method for analysis of 7-dehydrocholesterol for the study of Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J. Lipid. Res.* **55**, 329–37 (2014).
16. McKeever, P.A.; Young, I.D.: Smith-Lemli-Opitz syndrome II: A disorder of the fetal adrenals? *J. Med. Genet.* **27**, 465–466 (1990).
17. Natowicz, M.R.; Evans, J.E.: Abnormal bile acids in the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **50**, 364–367 (1994).
18. Xu, L.; Korade, Z.; Rosado, D.A.; Liu, W.; Lamberson, C.R.; Porter, N.A.: An oxysterol biomarker for 7-dehydrocholesterol oxidation in cell/mouse models for Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J. Lipid. Res.* **52**, 1222–1233 (2011).
19. Porter, N.A.: Mechanisms for the Autoxidation of Polyunsaturated Lipids. *Acc. Chem. Res.* **19**, 262–268 (1986).
20. Schroepfer, G.J.; Wilson, W.K.: Oxysterols: Modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev.* **80**, 361–554 (2000).
21. Korade, Z.; Xu, L.; Shelton, R.; Porter, N.A.: Biological activities of 7-dehydrocholesterol-derived oxysterols: Implications for Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J. Lipid. Res.* **51**, 3259–69 (2010).

-
22. Holick, M.F.; Maclaughlin, J.A.; Clark, M.B.; Holick, S.A.; Potts, J.T.; Anderson, R.R.: Photosynthesis of previtamin D₃ in human skin and the physiologic consequences. *Science* **210**, 203–205 (1980).
 23. Goluszko, P.; Nowicki, B.: Membrane Cholesterol: a Crucial Molecule Affecting Interactions of Microbial Pathogens with Mammalian Cells. **73**, 7791–7796 (2005).
 24. Lowry, R.B.; Yong, S.L.: Borderline normal intelligence in the Smith-Lemli-Opitz (RSH) syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **5**, 137–143 (1980).
 25. Kelley, R.I.: A new face for an old syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **68**, 251–256 (1997).
 26. Kelley, R.I.; Hennekam, R.C.M.: The Smith-Lemli-Opitz syndrome. **37**, 321–335 (2000).
 27. Yang, Y.; Yassan, L.; Ki, E.; Leung, Y.; Yeo, K.J.: Smith-Lemli-Opitz Syndrome in a newborn infant with developmental abnormalities and low endogenous cholesterol. *Clin. Chim. Acta* **479**, 208–211 (2018).
 28. DeBarber, A.E.; Eroglu, Y.; Merkens, L.S.; Pappu, A.S.; Steiner, R.D.: Smith-Lemli-Opitz Syndrome. *Expert. Rev. Mol. Med.* **13**, 1–24 (2011).
 29. Donnai, D.; Young, I.D.; Owen, W.G.; Clark, S.A.; Miller, P.F.; Knox, W.F.: The lethal multiple congenital anomaly syndrome of polydactyly, sex reversal, renal hypoplasia, and unilobular lungs. *J. Med. Genet.* **23**, 64–71 (1986).
 30. Bialer, M.G.; Penchaszadeh, V.B.; Kahn, E.; Libes, R.; Krigsman, G.; Lesser, M.L.: Female external genitalia and Mullerian duct derivatives in a 46,XY infant with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **28**, 723–731 (1987).
 31. Cunniff, C.; Kratz, L.E.; Moser, A.; Natowicz, M.R.; Kelley, R.I.: Clinical and biochemical spectrum of patients with RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome and abnormal cholesterol metabolism. *Am. J. Med. Genet.* **68**, 263–269 (1997).

32. Kratz, L.E.; Kelley, R.I.: Prenatal Diagnosis of the RSH / Smith-Lemli-Opitz Syndrome. *Am. J. of Med. Gen.* **82**, 376–381 (1999).
33. Nowaczyk, M.J.M.; Irons, M.B.: Smith-Lemli-Opitz Syndrome: Phenotype, Natural History, and Epidemiology. **262**, 250–262 (2012).
34. Tint, G.S.; Salen, G.; Batta, A.K.; Shefer, S.; Irons, M.; Elias, E.R.: Correlation of severity and outcome with plasma sterol levels in variants of the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Pediatr.* **127**, 82–87 (1995).
35. Yu, H.: Spectrum of Delta7-dehydrocholesterol reductase mutations in patients with the Smith-Lemli-Opitz (RSH) syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 1385–1391 (2000).
36. Ryan, A.K.; Bartlett, K.; Clayton, P.; Eaton, S.; Mills, L.; Donnai, D.: Smith-Lemli-Opitz syndrome: A variable clinical and biochemical phenotype. *J. Med. Genet.* **35**, 558–65 (1998).
37. Tierney, E.; Nwokoro, N.A.; Porter, F.D.; Freund, L.S.; Ghuman, J.K.; Kelley, R.I.: Behavior phenotype in the RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **98**, 191–200 (2001).
38. Irons, M.; Elias, E.R.; Abuelo, D.; Bull, M.J.; Greene, C.L.; Johnson, V.P.: Treatment of Smith-Lemli-Opitz syndrome: Results of a multicenter trial. *Am. J. Med. Genet.* **68**, 311–314 (1997).
39. Cruz, M.L.; Wong, W.W.; Mimouni, F.; Hachey, D.L.; Setchell, K.D.; Klein, P.D.: Effects of infant nutrition on cholesterol synthesis rates. *Pediatr. Res.* **35**, 135–40 (1994).
40. Nwokoro, N.A.: Cholesterol and bile acid replacement therapy in children and adults with Smith-Lemli-Opitz (SLO/RSH) syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **68**, 315–321 (1997)
41. Linck, L.M.; Lin, D.S.; Flavell, D.; Connor, W.E.; Steiner, R.D.: Cholesterol

- supplementation with egg yolk increases plasma cholesterol and decreases plasma 7-dehydrocholesterol in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **93**, 360–365 (2000).
42. Sikora, D.M.; Ruggiero, M.; Petit-Kekel, K.; Merkens, L.S.; Connor, W.E.; Steiner, R.D.: Cholesterol supplementation does not improve developmental progress in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J. Pediatr.* **144**, 783–791 (2004).
 43. Jira, P.E.; Wevers, R.A.; Jong, J.D.; Rubio-gozalbo, E.; Janssen-zijlstra, F.S.M.; Heyst, A.F.J.: Simvastatin: a new therapeutic approach for Smith-Lemli-Opitz syndrome. **41**, 1339–1346 (2000).
 44. Correa-Cerro, L.S.; Wassif, C.A.; Kratz, L.; Miller, G.F.; Munasinghe, J.P.; Grinberg, A.: Development and characterization of a hypomorphic Smith-Lemli-Opitz syndrome mouse model and efficacy of simvastatin therapy. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 839–851 (2006).
 45. Chan, Y.M.; Merkens, L.S.; Connor, W.E.; Rouillet, J.B.; Penfield, J.A.; Jordan, J.M.: Effects of dietary cholesterol and simvastatin on cholesterol synthesis in Smith-lemli-opitz syndrome. *Pediatr. Res.* **65**, 681–685 (2009).
 46. Haas, D.; Garbade, S.F.; Vohwinkel, C.; Muschol, N.; Trefz, F.K.; Penzien, J.M.: Effects of cholesterol and simvastatin treatment in patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome (SLOS). *J. Inherit. Metab. Dis.* **30**, 375–87 (2007).
 47. Kelley, R.I.: Diagnosis of Smith-Lemli-Opitz syndrome by gas chromatography / mass spectrometry of 7-dehydrocholesterol in plasma, amniotic fluid and cultured skin fibroblasts. *Clin. Chim. Acta* **236**, 45–58 (1995).
 48. Rossiter, J.P.; Hofman, K.J.; Kelley, R.I.: Smith-Lemli-Opitz syndrome: Prenatal diagnosis by quantification of cholesterol precursors in amniotic fluid. *Am J Med Genet.* **56**, 272–275 (1995).

-
49. Sharp, P.; Haant, E.: FIRST-TRIMESTER DIAGNOSIS OF SMITH-LEMLI- OPITZ SYNDROME. *Prenatal diagnosis* **17**, 355–361 (1997).
 50. Shackleton, C.H.; Roitman, E.; Kratz, L.; Kelley, R.: Dehydroestriol and dehydropregnanetriol are candidate analytes for prenatal diagnosis of Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Prenat. Diagn.* **21**, 207–212 (2001).
 51. Shackleton, C.H.; Marcos, J.; Palomaki, G.E.; Craig, W.Y.; Kelley, R.I.; Kratz, L.E.: Dehydrosteroid measurements in maternal urine or serum for the prenatal diagnosis of Smith-Lemli-Opitz syndrome (SLOS). *Am. J. Med. Genet Part A* **143**, 2129–2136 (2007).
 52. Gelzo, M.; Clericuzio, S.; Barone, R.; D’Apolito, O.; Russo, A.; Corso, G.: A routine method for cholesterol and 7-dehydrocholesterol analysis in dried blood spot by GC-FID to diagnose the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **907**, 154–158 (2012).
 53. Corso, G.; Rossi, M.; De Brasi, D.; Rossi, I.; Parenti, G.; Dello Russo, A.: Effects of sample storage on 7- and 8-dehydrocholesterol levels analysed on whole blood spots by gas chromatography-mass spectrometry-selected ion monitoring. *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **766**, 365–70 (2002).
 54. Ziramerman, P.A.; Hercules, D.M.; Naylor, E.W.: Direct analysis of filter paper blood specimens for identification of Smith-Lemli-Opitz syndrome using time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Am. J. Med. Genet.* **68**, 300–4 (1997).
 55. Paglia, G.; D’Apolito, O.; Gelzo, M.; Dello Russo, A.; Corso, G.: Direct analysis of sterols from dried plasma/blood spots by an atmospheric pressure thermal desorption chemical ionization mass spectrometry (APTDCI-MS) method for a rapid screening of Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Analyst.* **135**, 789–796 (2010).
 56. Liu, W.; Xu, L.; Lamberson, C.R.; Merkens, L.S.; Steiner, R.D.; Elias, E.R.: Assays

- of plasma dehydrocholesteryl esters and oxysterols from Smith-Lemli-Opitz syndrome patient. *J. Lipid. Res.* **54**, 244–253 (2013).
57. Honda, A.; Yamashita, K.; Miyazaki, H.; Shirai, M.; Ikegami, T.; Xu, G.: Highly sensitive analysis of sterol profiles in human serum by LC-ESI-MS/MS. *J. Lipid. Res.* **49**, 2063–2073 (2008).
58. Xiong, Q.; Ruan, B.; Whitby, F.G.; Tuohy, R.P.; Belanger, T.L.; Kelley, R.I.: A colorimetric assay for 7-dehydrocholesterol with potential application to screening for Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Chem. Phys. Lipids*. **115**, 1–15 (2002).
59. Abell, L.L.; Levy, B.B.; Brodie, B.B.; Kendall, F.E.: A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. *J. Biol. Chem.* **195**, 357–366 (1952).
60. Xiong, Q.; Wilson, W.K.; Pang, J.: The Liebermann-Burchard reaction: Sulfonation, desaturation, and rearrangement of cholesterol in acid. *Lipids* **42**, 87–96 (2007).
61. Bianconi, S.E.; Cross, J.L.; Wassif, C.A.; Porter, F.D.: Pathogenesis, epidemiology, diagnosis and clinical aspects of Smith–Lemli–Opitz syndrome. *Expert Opin Orphan Drugs* **3**, 267–280 (2015).
62. Lanthaler, B.; Hinderhofer, K.; Maas, B.; Haas, D.; Sawyer, H.; Burton-Jones, S.: Characterization of large deletions in the DHCR7 gene. *Clin. Genet.* **88**, 149–154 (2015).
63. Patrono, C.; Rizzo, C.; Tessa, A.; Giannotti, A.; Borrelli, P.; Carrozzo, R.: Novel 7-DHCR mutation in a child with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **91**, 138–140 (2000)..
64. Bukelis, I.; Porter, F.D.; Zimmerman, A.W.; Tierney, E.: Smith-Lemli-Opitz syndrome and autism spectrum disorder. *Am. J. Psychiatry* **164**, 1655–1661 (2007).
65. Klouda, J.; Barek, J.; Nesměrák, K.; Schwarzová-Pecková, K.: Non-Enzymatic

- Electrochemistry in Characterization and Analysis of Steroid Compounds. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **47**, 384–404 (2017).
66. Pollegioni, L.; Piubelli, L.; Molla, G.: Cholesterol oxidase: Biotechnological applications. *FEBS. J.* **276**, 6857–6870 (2009).
67. Morzycki, J.W.; Sobkowiak, A.: Electrochemical oxidation of cholesterol. *Beilstein J. Org. Chem.* **11**, 392–402 (2015).
68. Brown, M.S.; Goldstein, J.L.: IN THE MACROPHAGE : Implications. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 223–261 (1983).
69. Shono, T.; Matsumura, Y.; Inoue, K.: Indirect Electrooxidation of Amines to Nitriles Using Halogen Ions as Mediators. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 6075–6076 (1984).
70. Kowalski, J.; Płoszyńska, J.; Sobkowiak, A.; Morzycki, J.W.; Wilczewska, A.Z.: Direct electrochemical acetoxylation of cholesterol at the allylic position. *J. Electroanal. Chem.* **585**, 275–280 (2005).
71. Kotani, A.; Hakamata, H.; Nakayama, N.; Kusu, F.: Picomole level determination of cholesterol by HPLC with electrochemical detection using boron-doped diamond electrode after performance assessment based on the FUMI theory. *Electroanalysis* **23**, 2709–2715 (2001).
72. Ferri, T.; Campanella, L.; De Angelis, G.: Differential-pulse polarographic determination of cholic acids. *Analyst* **109**, 923–925 (1984).
73. Brown, W.D.: Determination of serum cholesterol with perchloric acid. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **37**, 523–531 (1959).
74. Klouda, J.; Nesměrák, K.; Kočovský, P.; Barek, J.; Schwarzová-Pecková, K.: A novel voltammetric approach to the detection of primary bile acids in serum samples. *Bioelectrochemistry* **134**, 1–28 (2020).

-
75. Medici, A.; Pedrini, P.; De Battisti, A.; Fantin, G.; Fogagnolo, M.; Guerrini, A.: Anodic electrochemical oxidation of cholic acid. *Steroids* **66**, 63–69 (2001).
 76. Lawrance, D.; Williamson, C.; Boutelle, M.G.; Cass, A.E.G.: Development of a disposable bile acid biosensor for use in the management of cholestasis. *Anal. Methods* **7**, 3714–3719 (2015).
 77. Zhang, X.; Zhu, M.; Xu, B.; Cui, Y.; Tian, G.; Shi, Z.: Indirect electrochemical detection for total bile acids in human serum. *Biosens. Bioelectron* **85**, 563–567 (2016).
 78. Koide, S.; Ito, N.; Karube, I.: Development of a micro-planar amperometric bile acid biosensor for urinalysis. *Biosens. Bioelectron* **22**, 2079–2085 (2007).
 79. Atuma, S.S.; Lindquist, J.: The Electrochemical Determination of Vitamin A. *Analyst* **100**, 827–834 (1975).
 80. Moody, J.P.; Humphries, C.A.; Allan, S.M.; Paterson, C.R.: Determination of 7-dehydrocholesterol in human skin by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **530**, 19–27 (1990).
 81. Ostermeyer, U.; Schmidt, T.: Vitamin D and provitamin D in fish: Determination by HPLC with electrochemical detection. *Eur. Food. Res. Technol.* **222**, 403–413 (2006).
 82. Klouda, J.: Elektrochemická oxidace vybraných žlučových kyselin v acetonitrilu. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta UK: Praha, **2013**.
 83. Klouda, J.: Elektrochemická oxidace žlučových kyselin na elektrodách na bázi uhlíku. Možnosti využití v elektroanalýze. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta UK: Praha, **2015**.
 84. Habániková, S.D.: Electrochemical oxidation of selected bile acids in acetonitrile. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta UK: Praha, **2017**.

-
85. Bláhová, E.: Voltametrické chování cholesterolu na elektrodě ze skelného uhlíku. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta UK: Praha, **2019**.
 86. Benešová, L.: Vývoj elektroanalytických metod pro detekci cholesterolu a 7-dehydrocholesterolu. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta UK: Praha, **2018**.
 87. Yershova, P.: Vývoj voltametrických metod pro detekci cholesterolu na bórem dopované diamantové elektrodě. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta UK: Praha, **2018**.
 88. Zelenský, M.: Voltametrické chování fytoosterolů na elektrodě ze skelného uhlíku. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta UK: Praha, **2018**.
 89. Jelšíková, K.: Voltametrie fytoosterolů na bórem dopované diamantové elektrodě. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta UK: Praha, **2018**.
 90. Zárbynická A.: Voltametrie 7-dehydrocholesterolu na bórem dopované diamantové elektrodě. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta UK: Praha, **2018**;
 91. Patel, K.; Hashimoto, K.; Fujishima A.: Application of Boron-Doped CVD-Diamond Film to Photoelectrode. *Denki Kagaku* **60** 659–661 (1992).
 92. Swain, G.M.; Ramesham, R.: The Electrochemical Activity of Boron-Doped polycrystalline Diamond Thin Film Electrodes. *Anal. Chem.* **65**, 345–351 (1993).
 93. Luong, J.H.T.; Male, K.B.; Glennon, J.D.: Boron-doped diamond electrode: synthesis, characterization, functionalization and analytical applications. *Analyst* **134**, 1965–1979 (2009).
 94. Granger, M.C.; Lister, T.E.; Swain, G.M.: Boron-doped thin-film electrode **69**, A591–A597 (1997).
 95. Yang, N.; Yu, S.; MacPherson, J.V.; Einaga, Y.; Zhao, H.; Zhao, G.: Conductive diamond: Synthesis, properties, and electrochemical applications. *Chem. Soc. Rev.* **48**, 157–204 (2019).

-
96. Einaga, Y.: Development of Electrochemical Applications of Boron-Doped Diamond Electrodes. *Bull Chem. Soc. Jpn.* **91**, 1752–1762 (2018).
 97. Baluchová, S.; Daňhel, A.; Dejmková, H.; Ostatná, V.; Fojta, M.; Schwarzová-Pecková, K.: Recent progress in the applications of boron doped diamond electrodes in electroanalysis of organic compounds and biomolecules – A review. *Anal. Chim. Acta* **1077**, 30–66 (2019).
 98. Pecková, K.; Musilová, J.; Barek, J.: Boron-doped diamond film electrodes-new tool for voltammetric determination of organic substances. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **39**, 148–172 (2009).
 99. Zhang, W.; Zhu, S.; Luque, R.; Han, S.; Hu, L.; Xu, G.: Recent development of carbon electrode materials and their bioanalytical and environmental applications. *Chem. Soc. Rev.* **45**, 715–752 (2016).
 100. Granger, M.C.; Witek, M.; Xu, J.; Wang, J.; Hupert, M.; Hanks, A.: Standard electrochemical behavior of high-quality, boron-doped polycrystalline diamond thin-film electrodes. *Anal. Chem.* **72**, 3793–3804 (2000).
 101. Boukherroub, R.; Wallart, X.; Szunerits, S.; Marcus, B.; Bouvier, P.; Mermoux, M.: Photochemical oxidation of hydrogenated boron-doped diamond surfaces. *Electrochem. commun.* **7**, 937–940 (2005).
 102. Ostrovskaya, L.; Perevertailo, V.; Ralchenko, V.; Dementjev, A.; Loginova, O.: Wettability and surface energy of oxidized and hydrogen plasma-treated diamond films. *Diam. Relat. Mater.* **11**, 845–850 (2002).
 103. Liu, F.B.; Wang, J.D.; Liu, B.; Li, X.M.; Chen, D.R.: Effect of electronic structures on electrochemical behaviors of surface-terminated boron-doped diamond film electrodes. *Diam. Relat. Mater.* **16**, 454–460 (2007).
 104. Bachmann, P.K.; Leers, D.; Lydtin, H.: Towards a general concept of diamond

- CVD. *Diamond Relat. Mater.* **1**, 1–12 (1991).
105. Werner, M.; Job, R.; Zaitzev, A.; Fahrner, W.R.; Seifert, W.; Johnston, C.: The relationship between resistivity and boron doping concentration of single and polycrystalline diamond. *Phys. Status Solidi Appl. Res.* **154**, 385–393 (1996).
 106. Enache, T.A.; Chiorcea-Paquim, A.M.; Fatibello-Filho, O.; Oliveira-Brett, A.M.: Hydroxyl radicals electrochemically generated in situ on a boron-doped diamond electrode. *Electrochem. commun.* **11**, 1342–1345 (2009).
 107. Hoffmann, R.; Obloh, H.; Tokuda, N.; Yang, N.; Nebel, C.E.: Fractional surface termination of diamond by electrochemical oxidation. *Langmuir* **28**, 47–50 (2012).
 108. Macpherson, J.V.: A practical guide to using boron doped diamond in electrochemical research. *Phys. Chem. Phys.* **17**, 2935–2949 (2015).
 109. Yoshimura, M.; Honda, K.; Kondo, T.; Uchikado, R.; Einaga, Y.; Rao, T.N.: Factors controlling the electrochemical potential window for diamond electrodes in non-aqueous electrolytes. *Diamond Relat. Mater.* **11**, 67–74 (2002).